

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表2003-525628
(P2003-525628A)

(43)公表日 平成15年9月2日(2003.9.2)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		48/00	4 B 0 2 4
38/46		A 6 1 P 1/00	4 B 0 5 0
48/00		5/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 1/00		9/00	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全381頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001-565863(P2001-565863)
(86)(22)出願日 平成13年2月22日(2001.2.22)
(85)翻訳文提出日 平成14年8月30日(2002.8.30)
(86)国際出願番号 PCT/US01/05496
(87)国際公開番号 WO01/066706
(87)国際公開日 平成13年9月13日(2001.9.13)
(31)優先権主張番号 60/186,658
(32)優先日 平成12年3月3日(2000.3.3)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/189,881
(32)優先日 平成12年3月16日(2000.3.16)
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ヒューマン ジノーム サイエンス、
インコーポレイテッド
Human Genome Sciences, Inc.
アメリカ合衆国 メリーランド 20850,
ロックビル, キー ウェスト アベニュー 9410
9410 Key West Avenue,
Rockville, Maryland 20850, United States of America
(74)代理人 弁理士 山本 秀策 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プロテインチロシンホスファターゼポリヌクレオチド、ポリペプチド、および抗体

(57)【要約】

本発明は、新規なヒトPTPaseポリペプチドに関する。本発明はまた、新規なヒトPTPaseヒトポリペプチドをコードする遺伝子のコード領域を含む単離された核酸に関する。また、本発明のヒトPTPaseポリペプチドを産生するための、ベクター、宿主細胞、抗体および組換え方法が提供される。本発明はさらに、これらの新規なヒトPTPaseポリペプチドに関する障害を診断するために有用な診断方法に関する。そして発明はさらに、これらの新規なヒトPTPaseポリペプチドに関する障害を処置するために有用な治療方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号Xに示されるポリヌクレオチド、またはATCC受託番号Zに含まれるcDNAによってコードされるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号Yの生物学的に活性なポリペプチドフラグメント、またはATCC受託番号Zに含まれるcDNA配列によってコードされる生物学的に活性なポリペプチドフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；

(c) 配列番号Yのポリペプチドエピトープ、またはATCC受託番号Zに含まれるcDNA配列によってコードされるポリペプチドエピトープをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) (a)～(c)において特定されるポリヌクレオチドのいずれか1つにストリンジェント条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであって、ここで、該ポリヌクレオチドは、A残基のみまたはT残基のみのヌクレオチド配列を有する核酸分子に、ストリンジェント条件下でハイブリダイズしない、ポリヌクレオチド、

からなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む、単離された核酸分子。

【請求項2】 前記ポリヌクレオチドが、可溶性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の単離された核酸分子。

【請求項3】 前記ポリヌクレオチドが、配列番号Yとして同定される配列、またはATCC受託番号Zに含まれるcDNA配列によってコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の単離された核酸分子。

【請求項4】 前記ポリヌクレオチドが、配列番号Xのヌクレオチド配列全体またはATCC受託番号Zに含まれるcDNAを含む、請求項1に記載の単離された核酸分子。

【請求項5】 前記ポリヌクレオチドがDNAである、請求項2に記載の単離された核酸分子。

【請求項6】 前記ポリヌクレオチドがRNAである、請求項3に記載の単離された核酸分子。

【請求項7】 請求項1に記載の単離された核酸分子を含む、ベクター。

【請求項8】 請求項7に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項9】 遺伝子発現を制御する異種調節エレメントに作動可能に連結されている請求項1に記載の核酸分子を含む、組換え宿主細胞。

【請求項10】 請求項9に記載の宿主細胞からコードされたポリペプチドを発現する工程、および該ポリペプチドを回収する工程を包含する、ポリペプチドの産生方法。

【請求項11】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号Yに示されるポリペプチド、またはcDNAによってコードされるポリペプチド；

(b) 配列番号Yのポリペプチドフラグメント、または該cDNAによってコードされるポリペプチド；

(c) 配列番号Yのポリペプチドエピトープ、または該cDNAによってコードされるポリペプチド；および

(d) 配列番号Yの改変体、
からなる群より選択される配列に少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、
単離されたポリペプチド。

【請求項12】 配列番号Yを有するポリペプチドを含む、請求項11に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項13】 請求項11に記載の単離されたポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項14】 請求項11に記載の単離されたポリペプチドを発現する、
組換え宿主細胞。

【請求項15】 単離されたポリペプチドを作製する方法であって、以下：

(a) 該ポリペプチドが発現されるような条件下で、請求項14に記載の組換え宿主細胞を培養する工程；および

(b) 該ポリペプチドを回収する工程、
を包含する、方法。

【請求項16】 請求項15に記載の方法によって產生される、ポリペプチ

ド。

【請求項17】 医学的状态を予防、処置、または緩和する方法であって、請求項1に記載のポリヌクレオチドの治療有効量を、哺乳動物被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項18】 被験体における病理学的状態、または病理学的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) 請求項1に記載のポリヌクレオチドにおける変異の存在または非存在を決定する工程；および

(b) 該変異の存在または非存在に基づいて病理学的状態、または病理学的状態に対する感受性を診断する工程、を包含する、方法。

【請求項19】 被験体において病理学的状態、または病理学的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) 生物学的サンプルにおける請求項11に記載のポリペプチドの発現の存在または量を決定する工程；および

(b) 該ポリペプチドの発現の存在または量に基づいて病理学的状態、または病理学的状態に対する感受性を診断する工程、を包含する、方法。

【請求項20】 請求項11に記載のポリペプチドに対する結合パートナーを同定する方法であって、以下：

(a) 請求項11に記載のポリペプチドを結合パートナーと接触させる工程；および

(b) 該結合パートナーが該ポリペプチドの活性をもたらすか否かを決定する工程、

を包含する、方法。

【請求項21】 請求項11に記載のポリペプチドの活性を改変する分子をスクリーニングする方法であって、以下：

(a) 該ポリペプチドを、アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有すると疑われる化合物と接触させる工程；および

(b) 該ポリペプチドの活性をアッセイする工程；
を包含する、方法。

【請求項22】 医学的狀態を予防、処置、または緩和する方法であって、
請求項11に記載のポリペプチドの治療有効量を、哺乳動物被験体に投与する工
程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、新規のプロテインチロシンキナーゼホスファターゼ (PTPase) タンパク質に関する。より詳細には、新規の PTPase ポリペプチドをコードする単離された核酸分子が提供される。新規の PTPase ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに結合する抗体が提供される。ヒト PTPase のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドを産生するための、ベクター、宿主細胞、ならびに組換え法および合成法もまた提供される。本発明はさらに、これらの新規の PTPase ポリペプチドに関連する障害を診断、処置、予防および／または予後診断をするために有用な、診断方法および治療方法に関する。本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するためのスクリーニング方法に関する。本発明はさらに、本発明のポリペプチドの産生および機能を阻害するための方法および／または組成物に関する。

【0002】

(発明の背景)

広範な範囲の細胞活性は、それぞれ、キナーゼおよびホスファターゼによって媒介される、標的タンパク質のリン酸化および脱リン酸化に反する作用を介して達成される。このような細胞活性としては、細胞接着、細胞シグナル伝達、細胞増殖、および細胞分化が挙げられる。

【0003】

代表的には、プロテインチロシンホスファターゼ (PTPase) は、以下のサイン: $[I/V]HCxAGxxR[S/T]G$ によって特徴付けられる約 240 アミノ酸の少なくとも 1 つ保存された触媒性 PTPase ドメインを含む。ホスファターゼ触媒活性の間に、基質のリン酸部分は、システイン残基からの求核攻撃を受け、チロシン残基に付加したリン酸基の除去を生じる (Nee1, B. G., および N. K. Tonks, Curr. Opin. Cell Biol., 9: 193-204 (1997))。

【0004】

多数のおよび多様なファミリーのタンパク質が、細胞内PTPaseおよび膜貫通PTPaseに小分割され得る。細胞内PTPase（例えば、造血細胞プロテイン（HCP）チロシンホスファターゼ（すなわちSHP））は、タンパク質-タンパク質相互作用、細胞局在化、および／または酵素活性に関与する調節配列によって、隣接される1つのPTPaseドメインを含む。膜貫通PTPase（例えば、CD45）は、1つ以上の細胞内PTPaseドメインが続く膜貫通ドメインを含む。膜貫通PTPaseは、原形質膜を横切るシグナルを伝達する際に関与すると考えられている（M. Streuli, Curr. Opin. Cell Biol., 8:182-88 (1996)）。

【0005】

プロテインチロシンホスファターゼは、広範な生物学的活性に関与することが見出されている。Schmidtらは、破骨細胞によって発現されるマウスPTPaseは、アレンドロネート（ALN）によって阻害される際に、インビトロで、破骨細胞形成および骨再吸収を阻害することを見出した（Schmidt, A., 等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 93:3068-73 (1996)）。このPTPaseは、破骨細胞によって骨再吸収を防止するインヒビターについての価値ある標的であり得る。

【0006】

ショウジョウバエのいくつかのレセプタープロテインチロシンホスファターゼ（RPTP）が、神経系を発達させる成長および指導に関する影響を深めることがさらに見出された。ショウジョウバエにおけるRPTP DPTP69Dの破壊は、蛹の致死を生じる。変異胚において、運動ニューロンの成長円錐は、標的筋肉群を認識するそれらの能力を欠損しているか、または、逆にこれらの標的を避ける経路に従う能力を欠損している。同様に、機能の喪失を生じるDLAR変異体は、適切な筋肉の標的に移動すること、そして、神経支配することが不可能である神経発達を生じる（Neel, B. G. およびN. K. Tonks, Curr. Opin. Cell Biol., 9:193-204 (1997)）。

【0007】

さらに、膜貫通 P T P a s e C D 4 5 は、T 細胞レセプターシグナル伝達に必要であることが見出されている。D C 4 5 について欠損している B 細胞および T 細胞は、C D 4 5 が、それらの抗原レセプターを介する T リンパ球および B リンパ球活性化について必要であることを実証した。より大きい C D 4 5 のイソ型を発現しないノックアウトマウスは、他の障害の中でも、胸腺成熟が欠けており、そして、機能的に障害性の T 細胞を有した (M. S t r e u l i , C u r r . O p i n . C e l l B i o l . , 8 : 1 8 2 - 8 8 (1 9 9 6)) 。

【 0 0 0 8 】

従って、新規のプロテインチロシンキナーゼファミリーメンバーを同定かつ活用する明らかな必要性が存在する。構造的に関連するが、このようなタンパク質は、種々の細胞型および組織型において様々な、かつ多才な機能を有し得る。本発明の精製したプロテインチロシンホスファターゼポリペプチドは、細胞シグナル伝達、およびその調節に関するさらなる分子の同定、特徴付け、および精製のために有用な研究ツールである。さらに、新規なプロテインチロシンホスファターゼの同定は、核酸レベルおよびタンパク質レベルでの、ある範囲の誘導体、アゴニストおよびアンタゴニストの開発を可能にし、これは、次いで、広範な状態（例えば、他の状態の中でも、細胞シグナル伝達、神経突起成長、細胞接着、および組織治癒障害）の処置および診断において適用を有する。

【 0 0 0 9 】

(発明の要旨)

本発明は、配列表に開示され、そして／または表 1 に記載され、そして A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) に寄託されたヒト c D N A プラスミドに含まれる、ポリヌクレオチド配列を含むか、または、その配列からなる単離された核酸分子を含む。これらの核酸分子のフラグメント、改変体、および誘導体もまた、本発明に含まれる。本発明はまた、P T P a s e ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むか、または、それらのポリヌクレオチドからなる単離された核酸分子を含む。本発明は、これらのポリヌクレオチドによってコードされる P T P a s e ポリペプチドをさらに含む。配列表に開示され、そして／または表 1 に記載され、そして A T C C に寄

託されたヒト cDNA プラスミドによってコードされるような P T P a s e ポリペプチドを含むか、または、それらのポリペプチドからなるアミノ酸配列が、さらに提供される。これらのポリペプチドに結合する抗体もまた、本発明に含まれる。これらのアミノ酸配列のポリペプチドのフラグメント、改変体、および誘導体もまた、これらのポリペプチドおよびこれらのポリペプチドを結合する抗体をコードするポリヌクレオチドと同様に、本発明に含まれる。

【0010】

(詳細な説明)

(表)

表1は、本願に関連して A T C C で成された寄託物の A T C C 寄託物、寄託日、および A T C C 受託番号を要約する。表1はさらに、cDNA クローン識別子、cDNA クローン識別子に含まれるベクターの種類、ヌクレオチド配列識別番号、開示される配列に含まれるヌクレオチド、開示された配列の開始コドンの5'ヌクレオチドの位置、アミノ酸配列識別番号、および開示された配列によってコードされる O R F の最後のアミノ酸を含む、以下の各「遺伝子番号」に関する情報を要約する。

【0011】

表2は、公的な E S T 配列のいずれか1つ以上のうちの少なくとも1、2、3、4、5、10以上が本発明の特定の実施形態から必要に応じて除外される、これらの公的な E S T を示す。

【0012】

表3は、表1において開示されたクローンに対応するポリヌクレオチドの発現プロフィールを要約する。第1列は、表1に開示される各コンティグ配列に関連するcDNA クローンについて、特有のクローン識別子「クローンID番号V」を提供する。列2の「ライブラリーコード」は、本発明のポリヌクレオチドを発現する組織および／または細胞株ライブラリーの発現プロフィールを示す。列2の各ライブラリーコードは、表4において提供されるライブラリーコードおよびライブラリーの説明に対応する組織／細胞供給源の識別子コードを表す。これらのポリヌクレオチドの発現は、試験される他の組織および／または細胞ライブラ

リーにおいて観察されなかった。当業者は、本発明の対応するポリヌクレオチドの顕著な発現パターンを示す組織を同定するためか、または顕著なおよび／もしくは特異的な組織の発現を示すポリヌクレオチドを同定するためにこの情報を慣用的に使用し得る。

【 0 0 1 3 】

表4、列1は、表3、列2に開示されたライブラリーコードを提供する。列2は、対応するライブラリーが由来した組織または細胞供給源の説明を提供する。疾患組織に対応するライブラリーコードは、用語「疾患」を有する列3に示される。列3における用語「疾患」の使用は、制限的なものではない。ライブラリーの組織供給源は、特異的（例えば、新生物）であるか、または疾患関連性（例えば、疾患器官の正常な部分由来の組織サンプル）であり得る。さらに、「疾患」の表示を欠くライブラリーは、なお疾患状態または障害に直接的または間接的に関与する供給源に由来し得、従って、その疾患状態または障害におけるさらなる有用性を有し得る。

【 0 0 1 4 】

（定義）

以下の定義は、本明細書全体を通して使用される特定の用語の理解を容易にするために提供される。

【 0 0 1 5 】

本発明において、「単離された（単離した）」とは、その本来の環境（例えば、それが天然に存在する場合は天然の環境）から取り出された物質をいい、したがって、その天然の状態から「人間の手によって」変更されている。例えば、単離されたポリヌクレオチドは、ベクターまたは組成物の一部であり得るか、あるいは細胞中に含まれ得、そしてなお「単離されている」状態であり得る。なぜなら、そのベクター、組成物、または特定の細胞は、そのポリヌクレオチドの本来の環境ではないからである。用語「単離された」は、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリー、細胞全体の総RNA調製物またはmRNA調製物、ゲノムDNA調製物（電気泳動により分離され、そしてプロットへトランスファーされたものを含む）、剪断された細胞全体のゲノムDNA調製物をも、本発明のポ

リヌクレオチド／配列の識別する特徴がないことが当該分野で示されている他の組成物をもいわない。

【0016】

本明細書中で使用される場合、「ポリヌクレオチド」とは、(表1の第5列に記載にされる)配列番号X (SEQ ID NO: X)に含まれる核酸配列を有する分子、または(表1の第2列に記載され、そしてATCC寄託番号Z中のATCCに寄託されたプラスミドのプール内に含まれる)cDNAプラスミドVをいう。例えば、このポリヌクレオチドは、5'および3'非翻訳配列、天然または人工のシグナル配列を伴うかまたは伴わないコード領域、タンパク質コード領域、ならびにこの核酸配列のフラグメント、エピトープ、ドメイン、および改変体を含む、全長cDNA配列のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」とは、広く定義される本発明のポリヌクレオチド(cDNAに対応する配列のポリAテールの翻訳から生じるポリフェニルアラニンペプチド配列もポリリジンペプチド配列も明らかに除く)によってコードされるアミノ酸配列を有する分子をいう。

【0017】

本発明では、配列番号Xの配列を含む代表的プラスミドが、American Type Culture Collection(「ATCC」)に寄託され、そしてまたは表1に記載されている。表1に示すように、各プラスミドは、cDNAクローンID(識別番号)およびATCC受託番号(ATCC受託番号Z)によって同定される。単一の寄託物としてプールし寄託したプラスミドは、同じATCC受託番号を有する。ATCCは、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USAに位置する。ATCC寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項に拠って行われた。

【0018】

本発明の「ポリヌクレオチド」はまた、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号Xに含まれる配列、またはその相補体(例えば、本明細書中に記載されるポリヌクレオチドフラグメントのうちのいずれか1つ、2つ

、3つ、4つ以上の相補体)、および/またはcDNAプラスミドVに含まれる配列(例えば、本明細書中に記載されるポリヌクレオチドフラグメントのうちのいずれか1つ、2つ、3つ、4つ以上の相補体)にハイブリダイズし得るポリヌクレオチドを含む。「ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件」とは、50%ホルムアミド、5×SSC(750mM NaCl、75mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%デキストラン硫酸、および20μg/ml変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中での42℃での一晚のインキュベーション、続いて0.1×SSC中で約65℃にてフィルターを洗浄することをいう。

【0019】

本発明の「ポリヌクレオチド」には、より低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件で本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズする核酸分子もまた含まれる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーおよびシグナル検出の変更は、主として、ホルムアミド濃度(より低い百分率のホルムアミドが、低下したストリンジェンシーを生じる);塩条件、または温度の操作を通じて達成される。例えば、より低いストリンジェンシー条件は、6×SSPE(20×SSPE=3M NaCl;0.2M NaH₂PO₄;0.02M EDTA、pH7.4)、0.5% SDS、30%ホルムアミド、100μg/mlサケ精子ブロッキングDNAを含む溶液中、37℃で一晚のインキュベーション;次いで1×SSPE、0.1% SDSを用いた50℃での洗浄を含む。さらに、さらにより低いストリンジェンシーを達成するために、ストリンジेंटなハイブリダイゼーション後に行われる洗浄は、より高い塩濃度(例えば、5×SSC)で行われ得る。

【0020】

上記の条件におけるバリエーションが、ハイブリダイゼーション実験においてバックグラウンドを抑制するために使用される代替的なブロッキング試薬の含有および/または置換によって達成され得ることに留意のこと。代表的なブロッキング試薬としては、デンハルト試薬、BLOTTO、ヘパリン、変性サケ精子DNA、および市販の特許処方物が挙げられる。特異的ブロッキング試薬の含有は

、適合性の問題に起因して、上記のハイブリダイゼーション条件の改変を必要とし得る。

【 0 0 2 1 】

もちろん、ポリ A + 配列（例えば、配列表に示される c D N A の任意の 3' 末端ポリ A + 領域（t r a c t））に、または T（もしくは U）残基の相補的ストレッチにのみハイブリダイズするポリヌクレオチドは、「ポリヌクレオチド」の定義に包含されない。なぜなら、このようなポリヌクレオチドは、ポリ（A）ストレッチまたはその相補体を含む任意の核酸分子（例えば、プライマーとしてオリゴ d T を用いて生成される、事実上任意の二本鎖 c D N A クローン）にハイブリダイズするからである。

【 0 0 2 2 】

本発明のポリヌクレオチドは、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドから構成され得、これは、非改変 R N A もしくは非改変 D N A または改変 R N A もしくは改変 D N A であり得る。例えば、ポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖の D N A、一本鎖領域と二本鎖領域との混合物である D N A、一本鎖および二本鎖の R N A、ならびに一本鎖領域と二本鎖領域との混合物である R N A、一本鎖、またはより代表的には二本鎖もしくは一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であり得る D N A および R N A を含むハイブリッド分子から構成され得る。さらに、このポリヌクレオチドは、R N A もしくは D N A または R N A および D N A の両方を含む、三本鎖領域から構成され得る。ポリヌクレオチドはまた、安定性のために、または他の理由のために改変された、1つ以上の改変された塩基または D N A 骨格もしくは R N A 骨格を含み得る。「改変された」塩基としては、例えば、トリチル化された塩基およびイノシンのような普通でない塩基が挙げられる。種々の改変が、D N A および R N A に対して行われ得；したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的、または代謝的に改変された形態を含む。

【 0 0 2 3 】

特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも 15、少なくとも 30、少なくとも 50、少なくとも 100、少なくとも 125、少なく

とも500または少なくとも1000個連続するヌクレオチドであるが、長さが300kb、200kb、100kb、50kb、15kb、10kb、7.5kb、5kb、2.5kb、2.0kbまたは1kb以下である。さらなる実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書において開示されるようなコード配列の一部を含むが、任意のイントロンの全てまたは一部を含まない。別の実施形態において、コード配列を含むポリヌクレオチドは、ゲノム隣接遺伝子（すなわち、ゲノム中の目的の遺伝子に対してゲノムにおいて5'側または3'側）のコード配列を含まない。他の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、1000、500、250、100、50、25、20、15、10、5、4、3、2、または1より多いゲノム隣接遺伝子のコード配列を含まない。

【0024】

「配列番号X (SEQ ID NO: X)」とは、表1の第5列に記載されるポリヌクレオチド配列をいい、一方、「配列番号Y」とは、表1の第10列に記載されるポリペプチド配列をいう。配列番号Xは、表1の第6列において特定される整数によって同定される。ポリペプチド配列の配列番号Yは、ポリヌクレオチド配列番号Xによってコードされる、翻訳されるオープンリーディングフレーム (ORF) である。ポリヌクレオチド配列は配列表に示され、すぐ後にすべてのポリペプチド配列が続く。従って、ポリヌクレオチド配列の配列番号2に対応するポリペプチド配列は、配列表に示される最初のポリペプチド配列である。以下、第2のポリペプチド配列は、配列番号3に示されるようなポリヌクレオチド配列に対応する、などとなる。

【0025】

本発明のポリペプチドは、ペプチド結合または改変されたペプチド結合、すなわち、ペプチドアイソスター (isostere) によって互いに連結したアミノ酸から構成され得、そして遺伝子がコードする20個のアミノ酸以外のアミノ酸を含み得る。このポリペプチドは、翻訳後プロセッシングのような天然のプロセスによって、または当該技術分野で周知の化学改変技術によってのいずれかで、改変され得る。このような改変は、基本書、およびより詳細な研究論文、ならびに多くの研究文献に十分記載される。改変は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、お

よびアミノ末端またはカルボキシル末端を含む、ポリペプチドのどこにでも生じ得る。同じ型の改変が、所定のポリペプチド中のいくつかの部位で同じまたは種々の程度で存在し得ることが理解される。また、所定のポリペプチドは多くの型の改変を含み得る。ポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として分枝状であり得、そしてポリペプチドは、分枝を含むかまたは含まない、環状であり得る。環状、分枝状および分枝した環状のポリペプチドは、天然の翻訳後プロセスから生じ得るか、または合成方法によって作製され得る。改変としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol) の共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化 (pegylation)、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のような、タンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA媒介付加、およびユビキチン化が挙げられる。(例えば、PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 第2版, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson編, Academic Press, New York, 1-12頁 (1983); Seifterら, Meth Enzymol 182: 626-646 (1990); Rattanら, Ann NY Acad Sci 663: 48-62 (1992) を参照のこと)。

[0 0 2 6]

本発明のポリペプチドは、任意の適切な様式で調製され得る。このようなポリペプチドには、天然に存在する単離されたポリペプチド、組換え的に産生されたポリペプチド、合成的に産生されたポリペプチド、またはこれらの方法の組み合

わせによって産生されたポリペプチドが含まれる。このようなポリペプチドを調製するための手段は、当該分野で十分に理解されている。

【 0 0 2 7 】

そのポリペプチドは、分泌タンパク質の形態（成熟型を含む）であり得るか、またはより大きなタンパク質（例えば、融合タンパク質（以下を参照のこと））の一部であり得る。さらなるアミノ酸配列を含むことは、しばしば有利である。このアミノ酸配列としては、分泌配列またはリーダー配列、プロ配列、精製を補助する配列（例えば、複数のヒスチジン残基）、または組換え産生の間の安定性のためのさらなる配列が挙げられる。

【 0 0 2 8 】

本発明のポリペプチドは、好ましくは、単離された形態で提供され、そして好ましくは実質的に精製される。ポリペプチドの組換え的に産生されたバージョン（分泌ポリペプチドを含む）は、本明細書中に記載されるかまたはさもなくば当該分野で公知の技術を使用して（例えば、S m i t h および J o h n s o n、G e n e 6 7 : 3 1 - 4 0（1988）において記載される1段階方法によって）、実質的に精製され得る。本発明のポリペプチドはまた、本明細書中に記載されるかまたはさもなくば当該分野で公知の技術（例えば、当該分野において周知である方法において本発明のポリペプチドに対して惹起された本発明の抗体）を使用して、天然の、合成の、または組換えの供給源から精製され得る。

【 0 0 2 9 】

「機能的活性」を示すポリペプチドによって、本発明の全長（完全）タンパク質に関連する1以上の既知の機能的活性を示し得るポリペプチドが意味される。このような機能的活性としては、生物学的活性、抗原性〔抗ポリペプチド抗体に結合（または結合についてポリペプチドと競合）する能力〕、免疫原性（本発明の特定のポリペプチドに結合する抗体を生成する能力）、本発明のポリペプチドとマルチマーを形成する能力、およびポリペプチドについてのレセプターまたはリガンドに結合する能力が挙げられるがこれらに限定されない。

【 0 0 3 0 】

「機能的活性を有するポリペプチド」とは、特定のアッセイ（例えば、生物学

的アッセイ)において測定した場合に、用量依存性ありまたはなしで、本発明のポリペプチドの活性と類似の活性であるが、その活性と必ずしも同一でない活性を示すポリペプチド(成熟型を含む)をいう。用量依存性が存在する場合、用量依存性は、そのポリペプチドの用量依存性と同一である必要はなく、むしろ本発明のポリペプチドと比較した場合の所定の活性における用量依存性と実質的に類似である(すなわち、候補ポリペプチドは、本発明のポリペプチドと比較してより高い活性、または約1/25以上、好ましくは1/10以上、そして最も好ましくは、約1/3以上の活性を示す)。

【0031】

ポリペプチド、ならびにそのフラグメント、改変体、誘導体、およびアナログの機能的活性は、種々の方法によってアッセイされ得る。

【0032】

例えば、全長ポリペプチドに対する抗体の結合について本発明の全長ポリペプチドと結合または競合する能力についてアッセイする1つの実施形態において、当該分野で公知の種々のイムノアッセイが使用され得、これらのアッセイ系としては、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドウィッチ」イムノアッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インサイチュイムノアッセイ(例えば、コロイド状金、酵素標識または放射性同位元素標識を使用する)、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ(例えば、ゲル凝集アッセイ、血球凝集アッセイ)、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイ、および免疫電気泳動アッセイなどのような技術を使用する競合的および非競合的アッセイ系が挙げられるがこれらに限定されない。1つの実施形態において、抗体結合は、一次抗体上の標識を検出することにより検出される。別の実施形態において、一次抗体は、一次抗体に対する二次抗体または試薬の結合を検出することによって検出される。さらなる実施形態において、二次抗体が標識される。イムノアッセイにおける結合を検出するための多くの手段が当該分野において公知であり、そして本発明の範囲内にある。

【0033】

別の実施形態では、リガンドが同定される場合、または本発明のポリペプチドフラグメント、改変体、または誘導体が多量体化する能力が評価される場合、結合が、例えば、還元および非還元ゲルクロマトグラフィー、タンパク質アフィニティークロマトグラフィー、ならびにアフィニティープロッティングのような当該分野で周知の手段によって、アッセイされ得る。一般には、Phizicky、E. ら、Microbiol. Rev. 59:94-123 (1995) を参照のこと。別の実施形態では、その基質への本発明のポリヌクレオチドの生理学的相関（シグナル伝達）がアッセイされ得る。

【 0 0 3 4 】

さらに、本明細書中に記載のアッセイ（例えば、実施例を参照のこと）および当該分野で公知の他のアッセイは、本発明のポリペプチドおよびそれらのフラグメント、改変体、誘導体、およびアナログが、ポリペプチドに関連した生物学的活性（インビトロまたはインビボのいずれかで）を惹起する能力を測定するために、慣用的に適用され得る。他の方法は当業者に公知であり、そして、本発明の範囲内である。

【 0 0 3 5 】

（本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド）

（遺伝子番号1によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子の翻訳産物は、マウスタンパク質チロシンホスファターゼ（例えば、Genbank登録番号BAA23761を参照のこと）と配列相同性を共有する。この遺伝子は、チロシンホスファターゼファミリーのタンパク質のメンバーと相同性を共有し、従って、この遺伝子の翻訳産物は、チロシンホスファターゼファミリーのタンパク質のメンバーと少なくともいくつかの生物学的活性を共有すると予想される。

【 0 0 3 6 】

この遺伝子は、滑液の線維芽細胞、微小血管内皮細胞、および乳癌組織において発現される。

【 0 0 3 7 】

従って、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル

中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに血管系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のため、ならびに乳癌のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に血管系の障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、血管組織、乳房組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくは細胞サンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【 0 0 3 8 】

本発明の好ましいポリペプチドは、配列番号7において残基：L e u - 1 2 ~ A s p - 3 2 および H i s - 3 8 ~ T r p 5 1 として示される免疫原性エペトープの一方または両方を含むか、またはこれらからなる。このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、これらのポリペプチドの1つ以上に結合する抗体と同様に、本発明に包含される。さらに、これらのポリペプチドのフラグメントおよび改変体（例えば、本明細書中に記載のフラグメント、これらのポリペプチドおよびストリンジェントな条件下でこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリペプチド）は、本発明によって包含される。本発明のこれらのフラグメントおよび改変体に結合する抗体もまた、本発明によって包含される。これらのフラグメントおよび改変体をコードするポリヌクレオチドもまた、本発明によって包含される。

【 0 0 3 9 】

微小血管内皮細胞および滑液線維芽細胞、ならびに乳癌組織における組織分布、ならびにマウスチロシンホスファターゼに対するこの遺伝子に対応する翻訳産物の相同性は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物、および抗体

が、血管系の組織および／または細胞に關与する細胞プロセスの調節の際、ならびに乳癌のような癌を制御する際に有用であり得る。

【 0 0 4 0 】

内皮細胞におけるこの遺伝子産物の発現は、血液細胞系列の脈管形成；新脈管形成；生存、分化、および増殖を含む、種々のプロセスにおけるこの遺伝子産物についての役割と一致する。この遺伝子に対応する翻訳産物はまた、脈管構造において産生され得、そして循環内の他の細胞（例えば、造血細胞）に対する効果を有する。この遺伝子に対応する翻訳産物は、造血細胞および身体中の他の細胞の増殖、生存、活性化、および／または分化を促進する役割を果たし得る。この組織分布は、この遺伝子に対応する、ポリペプチド、翻訳産物、および抗体が、心血管系の状態および病変（例えば、心臓疾患、狭窄、アテローム性動脈硬化症、発作、アンギナ、血栓症、および創傷治癒）の診断および／または処置に有用であることを示す。

【 0 0 4 1 】

あるいは、乳癌組織におけるこの組織分布は、この遺伝子の翻訳産物が、乳癌の診断、検出、および／または処置に有用であることを示す。従って、この遺伝子の翻訳産物の一部に特異的に結合する抗体および／または低分子が好ましい。乳癌を検出するためのキットもまた提供される。1つの実施形態において、このようなキットは、固体支持体に結合するこの遺伝子の翻訳産物に特異的な抗体を含む。また、個体における乳癌を検出する方法も提供され、この方法は、この遺伝子の翻訳産物に特異的な抗体を、個体由来の体液（好ましくは、血清）に接触させ、そして抗体が、体液中に見出される抗原に結合するか否かを確認する工程を包含する。好ましくは、この抗体は固体支持体と結合され、そして体液は血清である。上記の実施形態ならびに他の治療および診断試験（キットおよび方法）は、本明細書中の他の場所でより詳細に記載する。タンパク質ならびにこのタンパク質に対する抗体は、上記に列挙された組織の腫瘍マーカーおよび／または免疫療法標的としての有用性を示し得る。

【 0 0 4 2 】

（遺伝子番号2によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子の翻訳産物は、コンタクチン (c o n t a c t i n) および他の細胞マトリクスタンパク質を結合する際、および細胞の増殖、分化、および生存を促進する際に関与すると考えられている、マウスニューレキシン (n e u r e x i n) レセプター (例えば、G e n b a n k 登録番号 A F 0 3 9 8 3 3 を参照のこと) と配列相同性を共有する。この遺伝子は、チロシンホスファターゼファミリーのタンパク質のメンバーと相同性を共有し、従って、この遺伝子の翻訳産物は、チロシンホスファターゼファミリーのタンパク質のメンバーと少なくともいくつかの生物学的活性を共有すると予想される。

【 0 0 4 3 】

この遺伝子は、ホジキンリンパ腫組織において発現される。

【 0 0 4 4 】

従って、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに免疫系の疾患および/または障害、特に、ホジキンリンパ腫を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に免疫系の障害に関して、標準の遺伝子発現レベル (すなわち、その障害を有さない個体由来の健全組織または体液中の発現レベル) に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型 (例えば、免疫組織、癌性組織および創傷組織) または体液 (例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液)、または別の組織もしくは細胞サンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【 0 0 4 5 】

本発明の好ましいポリペプチドは、配列番号 8 において残基 : L e u - 2 7 ~ P r o - 3 4 、 A r g - 5 5 ~ G l y - 6 0 、 A l a - 1 2 8 ~ A n s - 1 3 4 、および T h r - 1 4 8 ~ P h e - 1 6 0 として示される免疫原性エピトープの 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つを含むか、またはこれらからなる。このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、これらのポリペプチドの 1 つ以上に

結合する抗体と同様に、本発明に包含される。さらに、これらのポリペプチドのフラグメントおよび改変体（例えば、本明細書中に記載のフラグメント、これらのポリペプチドおよびストリンジェントな条件下でこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリペプチド）は、本発明によって包含される。本発明のこれらのフラグメントおよび改変体に結合する抗体もまた、本発明によって包含される。これらのフラグメントおよび改変体をコードするポリヌクレオチドもまた、本発明によって包含される。

【 0 0 4 6 】

ホジキンリンパ腫組織における組織分布およびチロシンホスファターゼ分子に対する相同性は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体が、免疫系の疾患および／または障害（特に、ホジキンリンパ腫）の診断、検出および／または処置に有用であることを示す。この遺伝子に対応する翻訳産物は、細胞の増殖、分化および生存を促進する際に、コンタクチン（c o n t a c t i n）または他の細胞外マトリクスタンパク質に結合し得る。この遺伝子に対応する翻訳産物はまた、リンパ球のホーミングおよび遊走に関与し得る。この遺伝子に対応する翻訳産物はまた、リガンド結合後のシグナル変換に関与し得る。

【 0 0 4 7 】

さらに、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体は、免疫系に関連した疾患および／または障害（例えば、ホジキンリンパ腫；器官移植に関連した、対宿主性移植片病および対移植片性宿主病；免疫欠損疾患（例えば、A I D S）；自己免疫障害（例えば、自己免疫性不妊症、水晶体組織損傷、脱髄、全身性エリテマトーデス、薬物誘導性の溶血性貧血、慢性関節リウマチ、シェーグレン病、強皮症；感染、ならびに他の炎症性疾患および合併症））の診断、検出、および／または処置のために有用である。タンパク質およびこのタンパク質に対する抗体は、上記に列挙した腫瘍および組織に対する腫瘍マーカーおよび免疫療法標的としての有用性を示し得る。

【 0 0 4 8 】

(遺伝子番号 3 によってコードされるタンパク質の特徴)

この遺伝子に対応する翻訳産物は、コンタクチンおよび他の細胞外マトリクスタンパク質との結合、ならびに細胞の増殖、分化および生存の促進に関与すると考えられている、マウスニューレキシンレセプター (Genbank 登録番号 AF039833 を参照のこと) と配列相同性を共有する。この遺伝子は、チロシンホスファターゼファミリーのメンバーのタンパク質と相同性を共有する。従って、この遺伝子の翻訳産物は、チロシンホスファターゼファミリーのメンバーのタンパク質と、少なくともいくつかの生物学的活性を共有することが予期される。

【 0 0 4 9 】

この遺伝子は、8 週齢の胚組織全体 (8-week old whole embryonic tissue) において発現される。

【 0 0 5 0 】

従って、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド (抗体を含む) は、生物学的サンプル中に存在する胚の組織または細胞型の差示的同定のため、ならびに発達系の疾患および/または障害を含むがこれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の差示的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に発達系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル (すなわち、障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル) に対して有意に高いまたは低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型 (例えば、胚組織、癌性組織および創傷組織) または体液 (例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液、および髄液)、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【 0 0 5 1 】

本発明の好ましいポリペプチドは、配列番号 9 において、残基: Glu-24 ~ Asp-32, Ser-46 ~ His-54, Arg-63 ~ Gly-68, Gly-98 ~ Ser-103, および Gln-122 ~ Ser-128 として

示される免疫原性エピトープのうちの1個、2個、3個、4個、または5個を含むか、またはこれらからなる。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、これらのポリペプチドの1つ以上を結合する抗体と同様に、本発明によって包含される。さらに、これらのポリペプチドのフラグメントおよび改変体（例えば、本明細書中に記載のフラグメント、これらのポリペプチドに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリペプチド、およびストリンジントな条件下で、これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドまたはその相補鎖によってコードされるポリペプチド）は、本発明によって包含される。本発明のこれらのフラグメントおよび改変体を結合する抗体もまた、本発明によって包含される。これらのフラグメントおよび改変体をコードするポリヌクレオチドもまた、本発明によって包含される。

【 0 0 5 2 】

胚組織全体における組織分布およびマウスニューレキシレセプターに対する相同性は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体が、発達系の疾患および／または障害の診断、検出および／または処置に有用であることを示す。この遺伝子に対応する翻訳産物は、細胞の増殖、分化および生存の促進に関与する、コンタクチンまたは他の細胞外マトリクスタンパク質の結合に関与し得る。この遺伝子に対応する翻訳産物はまた、リンパ球のホーミングおよび遊走に関与し得る。

【 0 0 5 3 】

さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物は、特にこの遺伝子の翻訳産物に対してリガンドが結合した後のシグナル変換に関与し得る。胚組織全体における発現を考慮すると、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体は、神経系、免疫系、造血系、心臓血管系、胃腸系、生殖系、内分泌系、骨格系、および筋系に影響する、発達に関連した障害の診断、検出および／または処置に有用である。タンパク質およびこのタンパク質に対する抗体は、上記に列挙した腫瘍および組織に対する腫瘍マーカーおよび免疫療法標的としての有用性を示し得る。

【 0 0 5 4 】

(遺伝子番号4によってコードされるタンパク質の特徴)

この遺伝子に対応する翻訳産物は、コンタクチンおよび他の細胞外マトリクスタンパク質との結合、ならびに細胞の増殖、分化および生存の促進に関与すると考えられている、マウスニューレキシニンレセプター (G e n b a n k 登録番号 A F 0 3 9 8 3 3 を参照のこと) と配列相同性を共有する。この遺伝子は、チロシンホスファターゼファミリーのメンバーのタンパク質と相同性を共有する。従って、この遺伝子の翻訳産物は、チロシンホスファターゼファミリーのメンバーのタンパク質と、少なくともいくつかの生物学的活性を共有することが予期される。

【 0 0 5 5 】

この遺伝子は、前立腺およびB細胞リンパ腫組織において発現される。

【 0 0 5 6 】

従って、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド (抗体を含む) は、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の差示的同定のため、ならびに前立腺の疾患および／または障害ならびに炎症性障害を含むがこれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の差示的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に前立腺および免疫系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル (すなわち、障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル) に対して有意に高いまたは低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型 (例えば、前立腺組織、免疫組織、癌性組織および創傷組織) または体液 (例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液、および髄液) 、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【 0 0 5 7 】

本発明の好ましいポリペプチドは、配列番号10において、残基 : T y r - 21 ~ G l y - 33 , A r g - 42 ~ G l n - 58 , A s n - 67 ~ C y s - 75 , C y s - 77 ~ A s p - 87 , A r g - 124 ~ T r p - 130 , および G l

u-211~Ser-216として示される免疫原性エピトープのうちの1個、2個、3個、4個、または5個以上を含むか、またはこれらからなる。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、これらのポリペプチドの1つ以上を結合する抗体と同様に、本発明によって包含される。さらに、これらのポリペプチドのフラグメントおよび改変体（例えば、本明細書中に記載のフラグメント、これらのポリペプチドに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリペプチド、およびストリンジェントな条件下で、これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドまたはその相補鎖によってコードされるポリペプチド）は、本発明によって包含される。本発明のこれらのフラグメントおよび改変体を結合する抗体もまた、本発明によって包含される。これらのフラグメントおよび改変体をコードするポリヌクレオチドもまた、本発明によって包含される。

【0058】

前立腺およびB細胞リンパ腫組織における組織分布ならびにマウスニューレキシンレセプターに対する相同性は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体が、前立腺および免疫系の疾患および／または障害の診断、検出および／または処置に有用であることを示す。この遺伝子に対応する翻訳産物は、細胞の増殖、分化および生存の促進に関与する、コンタクチンまたは他の細胞外マトリクスタンパク質に結合し得る。この遺伝子に対応する翻訳産物はまた、リンパ球のホーミングおよび遊走に関与し得る。

【0059】

前立腺組織および免疫系組織における組織分布を考慮すると、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体は、前立腺の炎症性障害（例えば、慢性前立腺炎、肉芽腫性前立腺炎、およびマラコプラキア）、または前立腺肥大、および前立腺腫瘍性障害（腺癌、移行上皮癌、腺管癌、および扁平上皮癌を含む）の診断、検出および／または処置に有用であり得る。タンパク質およびこのタンパク質に対する抗体は、上記に列挙した腫瘍および組織に対する腫瘍マーカーおよび免疫療法標的としての有用性を示し得る。

【 0 0 6 0 】

(遺伝子番号 5 によってコードされるタンパク質の特徴)

この遺伝子の翻訳産物は、ヒト CASPR / p 1 9 0 リガンド (国際公開 WO 9 7 / 3 5 8 7 2 を参照のこと) と配列相同性を共有する。この遺伝子は、ニューレキシニンレセプターに対する相同性を有する新規なレセプターチロシンホスファターゼをコードすると考えられる。この遺伝子は、精巣細胞の増殖、分化、および生存の促進に関与する、コンタクチンまたは他の細胞外マトリクスタンパクに結合することによって機能し得る。この相同性に基づいて、これらのタンパク質は、少なくともいくつかの生物学的活性を共有すると考えられる。

【 0 0 6 1 】

この遺伝子は、精巣および乳児脳組織において発現される。

【 0 0 6 2 】

従って、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド (抗体を含む) は、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の差示的同定のため、ならびに精巣および神経系の疾患および / または障害を含むがこれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の差示的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に生殖系および神経系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル (すなわち、障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル) に対して有意に高いまたは低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型 (例えば、神経組織、生殖組織、癌性組織および創傷組織) または体液 (例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液、および髄液) 、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【 0 0 6 3 】

本発明の好ましいポリペプチドは、配列番号 1 1 において、残基 : L e u - 1 1 ~ A l a - 1 8 , A l a - 3 8 ~ G l y - 4 3 , P r o - 7 2 ~ P r o - 9 5 , P h e - 1 6 2 ~ T h r - 1 6 7 , L e u - 1 9 8 ~ G l u - 2 0 3 , A s p - 2 3 6 ~ G l n - 2 4 2 , S e r - 2 6 6 ~ A s p - 2 7 1 , P r o - 3 2 2

～Thr-332, Ile-342～Pro-347, およびTyr-381～Ser-396として示される免疫原性エピープのうちの1個、2個、3個、4個、または5個以上を含むか、またはこれらからなる。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、これらのポリペプチドの1つ以上を結合する抗体と同様に、本発明によって包含される。さらに、これらのポリペプチドのフラグメントおよび改変体（例えば、本明細書中に記載のフラグメント、これらのポリペプチドに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリペプチド、およびストリンジェントな条件下で、これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドまたはその相補鎖によってコードされるポリペプチド）は、本発明によって包含される。本発明のこれらのフラグメントおよび改変体を結合する抗体もまた、本発明によって包含される。これらのフラグメントおよび改変体をコードするポリヌクレオチドもまた、本発明によって包含される。

【 0 0 6 4 】

精巣組織および乳児脳組織における組織分布ならびにニューレキシニンレセプターに対する相同性は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体が、神経系および／または生殖系の疾患および／または障害の診断、検出および／または処置に有用であることを示す。この遺伝子に対応する翻訳産物は、このレセプターへのリガンドの結合後のシグナル変換において役割を果たすと考えられる。この遺伝子に対応する翻訳産物は、精巣細胞の増殖、分化および／または生存の促進において有用であると考えられる。

【 0 0 6 5 】

さらに、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物、および抗体は、避妊薬の開発、ならびに、クラインフェルター症候群、精索静脈瘤、精巣炎、雄性機能障害、精巣新生物、および／または炎症性障害（例えば、精巣上体炎）のような障害から生じる雄性不妊障害において使用され得る。この遺伝子に対応する翻訳産物は、ヒト生殖細胞系または精子の維持、発達および／または生存において役割を果たし得る。

【 0 0 6 6 】

より一般的には、乳児脳組織における組織分布は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体が、神経変性疾患状態および行動障害（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、ツレット症候群、精神分裂病（schizophrenia）、躁病、痴呆、偏執症、強迫性障害、恐慌性障害、学習障害、ALS、精神病、自閉、および行動変化（栄養補給、睡眠パターン、平衡、および知覚の障害を含む）の検出および／または処置に有用であることを示す。さらに、この遺伝子または遺伝子産物は、発達中の胚に関連した発達障害、または伴性障害の処置および／または検出において役割を果たし得る。タンパク質およびこのタンパク質に対する抗体は、上記に列挙した組織に対する腫瘍マーカーおよび免疫療法標的としての有用性を示し得る。

【 0 0 6 7 】

【 表 1 】

表 1

遺伝子番号	cDNA クローン ID 番号:V	ATCC 受託 番号:Z および日付	ベクター	ヌクレオチド 配列 番号:X	総ヌクレオチド 配列	クロー ン配 列の 5'ヌ クレ オチド	クロー ン配 列の 3'ヌ クレ オチド	開始コ ドンの 5'ヌク レオチ ド	アミノ酸 配列 番号 Y	ORF の最 後の アミノ 酸
1	HATBM23	PTA1452 03/03/00	Uni-ZAP XR	2	1832	1	1832	19	7	67
2	HDIBD67	PTA1452 03/03/00	pCMV Sport 2.0	3	1627	1	1627	162	8	229
3	HE8T269	PTA1452 03/03/00	Uni-ZAP XR	4	1573	1	1573	35	9	155
4	HBJHX73	PTA1452 03/03/00	Uni-ZAP XR	5	1312	1	1312	142	10	216
5	HTEJM25	PTA1477 03/13/00	Uni-ZAP XR	6	1504	1	1504	106	11	410

表 1 は、上記の各「遺伝子番号」に対応する情報をまとめる。「ヌクレオチド配列番号 X」として同定されるヌクレオチド配列は、表 1 において同定される「cDNA クローン ID : V」から、およびいくつかの場合において、さらなる関連の DNA クローンから得られる部分的に相同な-(「重複する」)配列から構築された。重複する配列は、高い重複性の単一の連続した配列に構築され(通常、各ヌクレオチド部位で 3 ~ 5 個の重複する配列)、配列番号 (SEQ ID NO) : X として同定される最終的な配列を得た。

【 0 0 6 8 】

cDNA クローン ID は、その日付に寄託され、そして「ATCC 受託番号 Z および日付」において列挙される対応する受託番号が与えられた。寄託物のいく

つかは、同じ遺伝子に対応する複数の異なるクローンを含む。「ベクター」とは、cDNAクローンID:Vにおいて含まれるベクターの型をいう。

【 0 0 6 9 】

「総ヌクレオチド配列」は、「遺伝子番号」によって同定されるコンティグにおけるヌクレオチドの総数をいう。寄託されたプラスミドは、これらの配列のすべてを含み、これらは、配列番号Xの「クローン配列の5'ヌクレオチド」および「クローン配列の3'ヌクレオチド」として示されるヌクレオチドの位置によって反映される。推定メチオニン開始コドン（存在する場合）の配列番号Xのヌクレオチドの位置は、「開始コドンの5'ヌクレオチド」として同定される。同様に、推定シグナル配列（存在する場合）の配列番号Xのヌクレオチドの位置は、「シグナルペプチドの最初のアミノ酸の5'ヌクレオチド」として同定される。

【 0 0 7 0 】

翻訳されたアミノ酸配列は、ポリヌクレオチド配列の最初の翻訳コドンで始まり、「アミノ酸配列番号Y」として同定されるが、他のリーディングフレームもまた、公知の分子生物学的技術を使用して容易に翻訳され得る。これらの選択的オープンリーディングフレームによって生成されるポリペプチドは、本発明によって特に意図される。

【 0 0 7 1 】

配列番号X（ここで、Xは、配列表に開示されたポリヌクレオチド配列のいずれかであり得る）および翻訳された配列番号Y（ここで、Yは、配列表に開示されたポリペプチド配列のいずれかであり得る）は、十分に正確であり、そしてそうでなければ、当該分野において周知でありかつ以下でさらに記載される種々の使用に適切である。例えば、配列番号Xは、配列番号Xに含まれる核酸配列または寄託されたプラスミドに含まれるcDNAを検出する核酸ハイブリダイゼーションプローブを設計する際における使用を含むが、これらに限定されない使用を有する。これらのプローブはまた、生物学的サンプル中の核酸分子にハイブリダイズし、それによって本発明の種々の法医学的方法、および診断方法を可能にする。同様に、配列番号Yから同定されるポリペプチドは、表1において同定され

た cDNA クローンによりコードされる分泌タンパク質に特異的に結合する抗体を産生することを含むが、これらに限定されない用途を有する。

【 0 0 7 2 】

それにもかかわらず、配列決定反応によって生じる DNA 配列は、配列決定のエラーを含み得る。エラーは、誤って同定されたヌクレオチドとして、または生じた DNA 配列におけるヌクレオチドの挿入もしくは欠失として存在する。誤って挿入されたか、または欠失されたヌクレオチドは、推定アミノ酸配列のリーディングフレームにおいてフレームシフトを引き起こす。これらの場合において、生じた DNA 配列は、実際の DNA 配列と 99.9% を超えて同一（例えば、1000 塩基を超えるオープンリーディングフレームにおける 1 塩基の挿入または欠失）であり得るにもかかわらず、推定アミノ酸配列は、実際のアミノ酸配列とは異なる。

【 0 0 7 3 】

従って、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列における正確さを必要とするこれらの適用のために、本発明は、配列番号 X として同定された作製されたヌクレオチド配列、および配列番号 Y として同定された推定上の翻訳されたアミノ酸配列のみならず、表 1 において記載されるような、ATCC に寄託された本発明のヒト cDNA を含むプラスミド DNA のサンプルもまた提供する。各々の寄託されたプラスミドのヌクレオチド配列は、公知の方法に従って寄託されたプラスミドの配列決定により容易に決定され得る。

次いで、推定アミノ酸配列は、このような寄託物から証明され得る。さらに、特定のプラスミドによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列はまた、ペプチド配列決定により、または寄託されたヒト cDNA を含む適切な宿主細胞中でタンパク質を発現し、このタンパク質を収集し、そしてその配列を決定することにより、直接的に決定され得る。

【 0 0 7 4 】

また、cDNA プラスミドを含むベクターの名称を表 1 に提供する。各ベクターは、当該分野において、慣用的に使用される。以下のさらなる情報は、利便性のために提供される。

【 0 0 7 5 】

ベクター Lambda Zap (米国特許第 5, 128, 256 号および同第 5, 286, 636 号)、Uni-Zap XR (米国特許第 5, 128, 256 号および同第 5, 286, 636 号)、Zap Express (米国特許第 5, 128, 256 号および同第 5, 286, 636 号) pBluescript (pBS) (Short, J. M. ら、Nucleic Acids Res. 16:7583-7600 (1988); Altting-Mees, M. A. および Short, J. M.、Nucleic Acids Res. 17:9494 (1989)) ならびに pBK (Altting-Mees, M. A. ら、Strategies 5:58-61 (1992)) は、Stratagene Cloning Systems, Inc.、11011 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037 から市販されている。pBS は、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そして pBK はネオマイシン耐性遺伝子を含む。ファージミド pBS は、λ Zap ベクターおよび Uni-Zap XR ベクターから切り出され得、そしてファージミド pBK は、Zap 発現ベクターから切り出され得る。両方のファージミドは、E. coli 株 XL-1 Blue (これもまた、Stratagene から入手可能である) に形質転換され得る。

【 0 0 7 6 】

ベクター pSport1、pCMVSport 1.0、pCMVSport 2.0 および pCMVSport 3.0 は、Life Technologies, Inc.、P. O. Box 6009, Gaithersburg, MD 20897 から得られた。全ての Sport ベクターはアンピシリン耐性遺伝子を含み、そして E. coli 株 DH10B (これもまた、Life Technologies から入手可能である) に形質転換され得る。例えば、Gruber, C. E. ら、Focus 15:59 (1993) を参照のこと。ベクター lafmid BA (Bento Soares, Columbia University, New York, NY) は、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そして E. coli 株 XL-1 Blue に形質転換され得る。ベクター pC

R (登録商標) 2. 1 (これはInvitrogen、1600 Faraday Avenue、Carlsbad、CA 92008から入手可能である) は、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてE. coli株DH10B (Life Technologiesから入手可能である) に形質転換され得る。例えば、Clark, J. M.、Nuc. Acids Res. 16: 9677-9686 (1988) およびMead, D. ら、Bio/Technology 9: (1991) を参照のこと。

【0077】

本発明はまた、配列番号X、配列番号Y、および/または寄託されたプラスミド (cDNAプラスミド: Z) に対応する遺伝子に関する。この対応する遺伝子は、本明細書中に開示される配列情報を使用して、公知の方法に従って単離され得る。このような方法は、開示された配列からプローブまたはプライマーを調製する工程、およびゲノム物質の適切な供給源から対応する遺伝子を同定または増幅する工程を包含するが、これらに限定されない。

【0078】

本発明においてまた提供されるものは、対立遺伝子改変体、オルトログ (ortholog)、および/または種ホモログである。当該分野において公知である手順は、本明細書中で開示された配列またはATCCに寄託されたクローンからの情報を用いて、配列番号X、配列番号Y、および/またはcDNAプラスミド: Vに対応する遺伝子の全長遺伝子、対立遺伝子改変体、スプライス改変体、全長コード部分、オルトログ、および/または種ホモログを得るために使用され得る。例えば、対立遺伝子改変体および/または種ホモログは、本明細書中に提供される配列から適切なプローブまたはプライマーを作製し、そして対立遺伝子改変体および/または所望のホモログについて適切な核酸供給源をスクリーニングすることにより単離および同定され得る。

【0079】

本発明は、配列番号Xの核酸配列および/またはcDNAプラスミド: Vを含むか、または代替的にこれらからなるポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、配列番号Yのポリペプチド配列、配列番号Xによりコードされるポリペプチ

ド、および／または cDNA プラスミド V 中の cDNA によりコードされるポリペプチドを含むか、または代替的にこれらからなるポリペプチドを提供する。配列番号 Y のポリペプチド配列、配列番号 X によりコードされるポリペプチド、および／または cDNA プラスミド V 中の cDNA によりコードされるポリペプチドを含むか、または代替的にこれらからなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明により包含される。本発明はさらに、配列番号 X の核酸配列の相補体、および／または cDNA プラスミド V 中の cDNA のコード鎖の相補体を含むか、または代替的にこれらからなるポリヌクレオチドを包含する。多くのポリヌクレオチド配列（例えば、EST 配列）は、公に利用可能であり、そして配列データベースを通してアクセス可能であり、そして本発明の着想の前に公に利用可能であったかもしれない。好ましくは、このような関連するポリヌクレオチドは、本発明の範囲から特に除外される。全ての関連配列を列挙することは、本出願の開示の責務を超えて過度に煩わしい。従って、好ましくは、配列番号 X は、一般式 $a - b$ により記載されるヌクレオチド配列（ここで、 a は配列番号 X の 1 と配列番号 X の最終ヌクレオチド - 15 との間の任意の整数であり、 b は 15 ～ 配列番号 X の最終ヌクレオチドの整数であり、ここで a および b の両方は配列番号 X に示されるヌクレオチド残基の位置に対応し、そしてここで b は $a + 14$ 以上である）を含む 1 つ以上のポリヌクレオチドが除外される。

【 0 0 8 0 】

（全長遺伝子の回収のための RACE プロトコル）

部分的 cDNA クローンは、Frohman, M. A ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8998 - 9002 (1988) に記載された cDNA 末端の高速増幅 (RACE) 手順を利用することにより全長を作製し得る。5' 末端または 3' 末端のいずれかが欠失している cDNA クローンは、翻訳の開始コドンまたは終止コドンのそれぞれに対して伸長する欠失塩基対を含むように再構築され得る。いくつかの場合において、cDNA は、そのために翻訳が開始できない。以下に、この本来の 5' RACE 手順の改変を簡単に記載する。ポリ A + または全 RNA を、Superscript II (Gibco / BRL) および cDNA 配列に特異的なアンチセンスプライマーまたは相補

的プライマーを用いて逆転写する。そのプライマーを、Microcon Concentrator (Amicon) を用いて反応から除去する。次いで、第1鎖cDNAを、dATPおよび末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ (Gibco/BRL) を用いて、連結する。このように、PCR増幅のために必要であるアンカー配列を産生する。第2鎖を、dA-テイル含有PCR緩衝液、Taq DNAポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus)、5'末端で3つの隣接制限部位 (XhoI、SalIおよびClaI) を含むオリゴdTプライマーならびにこれらの制限部位を適切に含むプライマーから合成する。この2本鎖cDNAを同じプライマーならびにネスティッドcDNA特異的アンチセンスプライマーを用いて40サイクルでPCR増幅する。このPCR産物を、エチジウムブロマイドアガロースゲル上でサイズ分離し、そして欠失しているタンパク質コードDNAの推定サイズのcDNA産物を含むゲルの領域を取り出す。cDNAを、Magic PCR Prep kit (Promega) を用いてアガロースゲルから精製し、XhoIまたはSalIを用いて制限消化し、そしてプラスミド (例えば、pBluescript SKII (Stratagene)) にXhoI部位およびEcoRV部位で連結する。このDNAを細菌に形質転換し、そしてこのプラスミドクローンを配列決定して、正確なタンパク質コード挿入物を同定する。正確な5'末端を、推定的に同定されたホモログを有するこの配列と部分的cDNAクローンを有する重複を比較することにより確認する。当該分野において公知の同様の方法および/または市販のキットを使用して、3'末端を増幅し、そして回収する。

【 0 0 8 1 】

いくつかの、品質管理キットが購入のために市販されている。上記と同様の試薬および方法は、全長遺伝子を回収をするための5' RACEおよび3' RACEの両方について、Gibco/BRLからキットの形態で供給される。第2のキットは、Clontechから入手可能である。このキットは、Dumasら、Nucleic Acids Res., 19: 5227-32 (1991) により開発された、関連技術の改変 (SLIC (一本鎖cDNAへの、一本鎖の連結)) である。手順における主な違いは、RNAを、逆転写後にアルカリ加

水分解し、そしてRNAリガーゼを使用して、第1鎖cDNAに、制限部位を含むアンカープライマーを連結することである。これは、過去に配列決定をするのが困難であったポリTの伸長を生じるdAテーリング反応における必要性を除去する。

【 0 0 8 2 】

RNAからの5' cDNAまたは3' cDNAを産生することの代替案は、cDNAライブラリー二本鎖DNAを使用することである。非対称性PCR増幅アンチセンスcDNA鎖は、アンチセンスcDNA特異的プライマーおよびプラスミドアンカープライマーを用いて合成する。これらのプライマーを取り出し、そして対称PCR反応を、ネステッドcDNA特異的アンチセンスプライマーおよびプラスミドアンカープライマーを用いて実施する。

【 0 0 8 3 】

(5' 末端配列または3' 末端配列を産生して全長遺伝子を得るための、RNAリガーゼのプロトコル)

一旦、目的の遺伝子が同定されると、本来のcDNAプラスミド中には存在しないかもしれない遺伝子の5' 部分または3' 部分の同定のためにいくつかの方法が利用可能になる。これらの方法は、以下を含むがこれらに限定されない：フィルタープローブ探索、特異的プローブを使用するクローン富化、ならびに5'

RACEおよび3' RACEと類似および同一のプロトコル。全長遺伝子は、ライブラリー中に存在し得、そして探索によって同定され得るが、一方、5' 末端または3' 末端を生成するために有用な方法は、欠けている情報を生成するために、本来のcDNAからの既存の配列情報を、使用することである。5' RACEに類似する方法は、所望の全長遺伝子の欠けている5' 末端を生成するために利用可能である（この方法は、Fromont-Racineら、Nucleic Acids Res., 21 (7) : 1683-1684 (1993) によって発表された）。簡潔には、特定のRNAオリゴヌクレオチドを、全長遺伝子RNA転写物をおそらく含むRNAの集団の5' 末端に連結し、そして連結されたRNAオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的の遺伝子の既知の配列に特異的なプライマーを含むプライマーセットを使用して、所望の全長遺

伝子の5'部分をPCR増幅する。次いで、この増幅した産物を配列決定し得、そしてこれを使用して全長遺伝子を生成し得る。この方法は、所望の供給源から単離された総RNAを用いて開始し、この手順における必要条件ではないが、ポリA RNAを使用し得る。次いで、RNA調製物を、必要ならばホスファターゼで処理して、後のRNAリガーゼ工程を妨害し得る分解または損傷RNAの5'リン酸基を排除し得る。次いで、使用された場合にホスファターゼを不活化し、そしてRNAをメッセンジャーRNAの5'末端に存在するキャップ構造を除去するために、タバコ酸性ピロホスファターゼを用いて処理する。この反応は、次いでT4 RNAリガーゼを用いてRNAオリゴヌクレオチドに連結され得る、キャップ切断RNAの5'末端に5'リン酸基を残す。次いで、この改変型RNA調製物を、遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを用いる、第一鎖cDNA合成のためのテンプレートとして使用し得る。次いで、第一鎖合成反応物を、連結されたRNAオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的のPTPase遺伝子の既知の配列に特異的なプライマーを用いる、所望の5'末端のPCR増幅のためのテンプレートとして使用し得る。次いで、得られた生成物を配列決定し、そして分析して5'末端配列が関連するPTPase遺伝子に属することを確認する。

[0 0 8 4]

(ポリヌクレオチドフラグメントおよびポリペプチドフラグメント)

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチド(核酸)の、ポリヌクレオチドフラグメントに関する。本発明において、「ポリヌクレオチドフラグメント」とは、以下である核酸配列を有するポリヌクレオチドをいう：cDNAプラスミドVに含まれるcDNAの一部か、もしくはcDNAプラスミドVに含まれるcDNAによりコードされるポリペプチドをコードするcDNAの一部；配列番号Xもしくはその相補鎖におけるポリヌクレオチド配列の一部；配列番号Yのポリペプチドの一部をコードするポリヌクレオチド配列；あるいは配列番号Xによりコードされるポリペプチドの一部をコードするポリヌクレオチド配列。本発明のヌクレオチドフラグメントは、好ましくは、少なくとも約15nt、そしてより好ましくは少なくとも約20nt、さらにより好ましくは少なくとも約30nt、そし

てなおより好ましくは少なくとも約40 nt、少なくとも約50 nt、少なくとも約75 nt、少なくとも約100 nt、少なくとも約125 nt、または少なくとも約150 ntの長さである。例えば、「少なくとも約20 ntの長さ」のフラグメントは、例えばcDNAプラスミドVのcDNAに含まれる配列または配列番号Xに示されるヌクレオチド配列もしくはその相補鎖由来の20以上の連続する塩基を含むことが意図される。この文脈において「約（おおよそ）」は、特に記載された値、あるいはそれより数個（5、4、3、2、または1）のヌクレオチドだけ大きいかまたは小さな値を含む。これらのヌクレオチドフラグメントは、本明細書中で議論されるように、診断プローブおよびプライマーとしての用途を含むが、それらに限定されない用途を有する。当然のことながら、より大きなフラグメント（例えば、少なくとも150、175、200、250、500、600、1000または2000のヌクレオチドの長さ）もまた、本発明に含まれる。

【 0 0 8 5 】

さらに、本発明のポリヌクレオチドフラグメントの代表例としては、例えば、配列番号Xまたはその相補鎖の以下のおおよそのヌクレオチド数の配列を含むか、あるいは以下のおおよそのヌクレオチド数の配列からなるフラグメントが挙げられる：1～50、51～100、101～150、151～200、201～250、251～300、301～350、351～400、401～450、451～500、501～550、551～600、601～650、651～700、701～750、751～800、801～850、851～900、901～950、951～1000、1001～1050、1051～1100、1101～1150、1151～1200、1201～1250、1251～1300、1301～1350、1351～1400、1401～1450、1451～1500、1501～1550、1551～1600、1601～1650、1651～1700、1701～1750、1751～1800、および／または1801～1832。この文脈において、「おおよそ（約）」は、特に記載された範囲、またはいずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個（5、4、3、2、または1）のヌクレオチドだけ大きいか、または小さな

範囲を含む。好ましくは、これらのフラグメントは、その配列が一部であるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの、機能的活性（例えば、生物学的活性）を有するポリペプチドをコードする。より好ましくは、これらのフラグメントは、本明細書中で議論されるようにプローブまたはプライマーとして使用され得る。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシー条件下でこれらのフラグメントの1つ以上にハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた本発明に含まれ、これらのポリヌクレオチドまたはフラグメントによりコードされるポリペプチドも同様に含まれる。

【 0 0 8 6 】

さらに、本発明のポリヌクレオチドフラグメントの代表例としては、例えば、cDNAプラスミドVに含まれるcDNAヌクレオチド配列、またはその相補鎖の以下のおおよそのヌクレオチド数の配列を含むか、あるいはそれらからなるフラグメントが挙げられる：1～50、51～100、101～150、151～200、201～250、251～300、301～350、351～400、401～450、451～500、501～550、551～600、651～700、701～750、751～800、800～850、851～900、901～950、951～1000、1001～1050、1051～1100、1101～1150、1151～1200、1201～1250、1251～1300、1301～1350、1351～1400、1401～1450、1451～1500、1501～1550、1551～1600、1601～1650、1651～1700、1701～1750、1751～1800、および／または1801～1832。この文脈において、「おおよそ（約）」は、特に記載された範囲、あるいはいずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個（5、4、3、2、または1）のヌクレオチドだけ大きいか、または小さな範囲を含む。好ましくは、これらのフラグメントは、cDNAプラスミドVに含まれるcDNAヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの機能的活性（例えば、生物学的活性）を有するポリペプチドをコードする。より好ましくは、これらのフラグメントは、本明細書中で議論されるように、プローブまたはプライマーとして使用され得る。ストリンジェントなハイブリダイゼーション

条件下またはより低いストリンジェンシー条件下で1つ以上のこれらのフラグメントにハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた本発明に含まれ、これらのポリヌクレオチドまたはフラグメントによりコードされるポリペプチドもまた、含まれる。

【 0 0 8 7 】

本発明において、「ポリペプチドフラグメント」とは、配列番号 Y に含まれるアミノ酸配列の一部、配列番号 X のポリヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列の一部、および／または cDNA プラスミド V 中の cDNA によってコードされるアミノ酸配列の一部であるアミノ酸配列をいう。タンパク質（ポリペプチド）フラグメントは、「自立構造（free-standing）」であり得るか、あるいはより大きなポリペプチド（このフラグメントが、部分または領域（最も好ましくは単一の連続した領域として）を形成する）内に含まれ得る。本発明のポリペプチドフラグメントの代表例としては、例えば、配列番号 Y のコード領域の、以下のおおよそそのアミノ酸数のアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなるフラグメントが挙げられる：1～20、21～40、41～60、61～80、81～100、102～120、121～140、141～160、161～180、181～200、201～220、221～240、241～260、261～280、281～300、301～320、321～340、341～360、361～380、381～400、および／または401～410。さらに、本発明のポリペプチドフラグメントは、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、110、120、130、140、または150のアミノ酸の長さであり得る。この文脈において、「約（おおよそ）」とは、特に記載された範囲または値、あるいはいずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個（5、4、3、2、または1）のアミノ酸だけ大きいかまたは小さな、範囲または値を含む。これらのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

【 0 0 8 8 】

タンパク質のN末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失が、タンパク質の1つ以

上の生物学的機能の損失の改変を生じるとしても、他の機能的活性（例えば、生物学的活性、多量体化する能力、リガンドに結合する能力）は、なお保持され得る。例えば、ポリペプチドの完全な形態または成熟形態を認識する抗体を誘導するおよび／または抗体に結合する、短縮型ムテインの能力は、完全なポリペプチド、または成熟ポリペプチドの大部分より少ない残基が、N末端から除去される場合には、一般的に保持される。完全なポリペプチドのN末端残基を欠く特定のポリペプチドが、このような免疫原性活性を保持するかどうかは、本明細書中に記載される慣用的な方法、およびそうでなければ当該分野において公知の別の方法によって容易に決定され得る。多数の欠失したN末端アミノ酸残基を有するムテインは、いくつかの生物学的活性または免疫原性活性を保持し得るようである。実際に、6つと同じくらい少ないアミノ酸残基からなるペプチドは、しばしば免疫応答を惹起し得る。

【 0 0 8 9 】

従って、本発明のポリペプチドフラグメントとしては、分泌タンパク質および成熟形態が挙げられる。さらに好ましいポリペプチドフラグメントとしては、アミノ末端もしくはカルボキシ末端またはその両方から、連続した一連の欠失した残基を有する分泌タンパク質、もしくは成熟形態が挙げられる。例えば、任意の数のアミノ酸（1～60の範囲）は、分泌ポリペプチドもしくは成熟形態のいずれかのアミノ末端から欠失され得る。同様に、任意の数のアミノ酸（1～30の範囲）が、分泌タンパク質もしくは成熟形態のカルボキシ末端から欠失され得る。さらに、上記のアミノ末端およびカルボキシ末端の欠失の任意の組み合わせは好ましい。同様に、これらのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドもまた好ましい。

【 0 0 9 0 】

本発明は、本明細書中で開示されるポリペプチド（例えば、配列番号Yのポリペプチド、配列番号Xに含まれるポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、および／またはcDNAプラスミドVに含まれるcDNAによりコードされるポリペプチド）のアミノ酸配列のアミノ末端から、1つ以上の欠失した残基を有するポリペプチドを、さらに提供する。特に、N末端の欠失は、一般式

$m - q$ によって記載され得、ここで q は、本発明のポリペプチド（例えば、配列番号 Y に開示されるポリペプチド）におけるアミノ酸残基の総数を表す全整数であり、そして m は、 $2 \sim q - 6$ の範囲の任意の整数として定義される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（フラグメントおよび／または改変体を含む）もまた、本発明に含まれる。

【 0 0 9 1 】

また、上記のように、タンパク質のC末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失が、このタンパク質の1つ以上の生物学的機能の損失の改変を生じるとしても、他の機能的活性（例えば、生物学的活性、多量体化する能力、リガンドに結合する能力）は、なお保持され得る。例えば、ポリペプチドの完全な形態または成熟形態を認識する抗体を誘導するおよび／またはこの抗体に結合する、短縮型ムテインの能力は、完全なポリペプチド、または成熟ポリペプチドの大部分より少ない残基が、C末端から除去される場合には、一般的に保持される。完全なポリペプチドのC末端残基を欠く特定のポリペプチドが、このような免疫原性活性を保持するか否かは、本明細書中に記載される慣用的な方法、およびそうでなければ当該分野において公知の他の方法によって容易に決定され得る。多数の欠失したC末端アミノ酸残基を有するムテインは、いくつかの生物学的活性または免疫原性活性を保持し得るようである。実際に、6つと同じくらい少ないアミノ酸残基からなるペプチドは、しばしば免疫応答を惹起し得る。

【 0 0 9 2 】

従って、本発明は、本明細書中で開示されるポリペプチド（例えば、配列番号 Y のポリペプチド、配列番号 X に含まれるポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、および／またはcDNAプラスミド V に含まれるcDNAによりコードされるポリペプチド）のアミノ酸配列のカルボキシ末端からの1つ以上の残基を有するポリペプチドを、さらに提供する。特に、C末端の欠失は、一般式 $1 - n$ によって記載され得、ここで n は、 $6 \sim q - 1$ の範囲の任意の全整数であり、そしてここで n は、本発明のポリペプチドにおけるアミノ酸残基の位置に対応する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（フラグメントおよび／または改変体を含む）もまた、本発明により含まれる。

【 0 0 9 3 】

さらに、上記のN末端またはC末端の欠失のいずれかを組み合わせて、N末端およびC末端欠失型ポリペプチドを産生し得る。本発明はまた、アミノ末端およびカルボキシ末端の両方から1つ以上の欠失したアミノ酸を有するポリペプチドを提供する。このポリペプチドは、一般的に、配列番号X（例えば、好ましくは配列番号Yとして開示されるポリペプチドを含むが、これに限定されない）および／またはcDNAプラスミドV中のcDNA、ならびに／あるいはそれらの相補鎖によってコードされるポリペプチドの、残基m-nを有する場合に記載され得、ここでnおよびmは、上記のような整数である。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（フラグメントおよび／または改変体を含む）もまた、本発明に含まれる。

【 0 0 9 4 】

配列番号Yのポリペプチドに含まれる任意のポリペプチド配列、配列番号Xとして記載されるポリヌクレオチド配列によってコードされる、任意のポリペプチド配列、またはcDNAプラスミドV中のcDNAによってコードされる任意のポリペプチド配列は、そのポリペプチドの特定の好ましい領域を決定するために、分析され得る。例えば、配列番号XまたはcDNAプラスミドV中のcDNAのポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、DNASTARコンピュータアルゴリズム（DNASTAR, Inc., 1228 S. Park St., Madison, WI 53715 USA; <http://www.dnastar.com/>）のデフォルトパラメーターを使用して、分析され得る。

【 0 0 9 5 】

DNASTARコンピュータアルゴリズムを使用して慣用的に得られ得るポリペプチドの領域としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：Garnier-Robsonの α -領域、 β -領域、ターン領域、およびコイル領域、Chou-Fasmanの α -領域、 β -領域、およびターン領域、Kyte-Doolittleの親水性領域および疎水性領域、Eisenbergの α -両親媒性領域および β -両親媒性領域、Karpplus-Schulzの可

撓性領域、E m i n i の表面形成領域ならびに高い抗原性指標の J a m e s o n - W o l f の領域。この点で、本発明の非常に好ましいポリヌクレオチドの中に、いくつかの構造的特徴（例えば、上記の特徴のいくつか（例えば、1、2、3または4））と組み合わせられる領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがある。

【 0 0 9 6 】

さらに、K y t e - D o o l i t t l e 親水性領域および疎水性領域、E m i n i 表面形成領域、ならびに高い抗原性指標の J a m e s o n - W o l f 領域（すなわち、J a m e s o n - W o l f プログラムのデフォルトパラメーターを使用して同定されるような、1.5より大きいか、または1.5に等しい抗原性指標を有する、4つ以上の連続するアミノ酸を含む）を慣用的に使用して、抗原性に対する高い程度の潜在性を表すポリペプチドの領域を決定し得る。高い抗原性の領域は、免疫応答の開始プロセスにおいて、抗原認識が生じ得る環境中のポリペプチドの表面上に曝されるようであるポリペプチドの領域を表す値を選択することによって、D N A S T A R 分析によるデータから決定される。

【 0 0 9 7 】

本発明の好ましいポリペプチドフラグメントは、そのアミノ酸配列がフラグメントであるポリペプチド配列の、機能的活性（例えば、生物学的活性）を示すアミノ酸配列を含むか、またはあるいは、これらからなるフラグメントである。「機能的活性」を示すポリペプチドとは、全長タンパク質と関連した1つ以上の公知の機能的活性（例えば、前述のような、生物学的活性、抗原性、免疫原性、および/または多量体化など）を示し得るポリペプチドを意味する。

【 0 0 9 8 】

他の好ましいポリペプチドフラグメントは、生物学的に活性なフラグメントである。生物学的に活性なフラグメントとは、本発明のポリペプチドの活性に対して、同一である必要はないが、類似する活性を示すフラグメントである。このフラグメントの生物学的活性は、改善された所望の活性、または低下した望ましくない活性を含み得る。

【 0 0 9 9 】

好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号 Y のポリペプチドの 1、2、3、4、5 以上の抗原性フラグメントか、またはその部分を含むか、またはあるいはそれらからなる。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（フラグメントおよび／または改変体を含む）もまた、本発明に含まれる。

【 0 1 0 0 】

本発明は、以下のポリペプチドを含むか、またはあるいは以下からなるポリペプチドを含む：配列番号 Y に示されるポリペプチド配列のエピトープ、または cDNA プラスミド V 中の cDNA によりコードされるポリペプチド配列のエピトープ、あるいは前述で定義されるように、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下で、配列番号 X のエピトープコード配列または cDNA プラスミド V に含まれるエピトープコード配列の相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド配列のエピトープ。本発明はさらに、本発明のポリペプチド配列のエピトープをコードするポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号 X に開示される配列など）、本発明のエピトープをコードするポリヌクレオチド配列の相補鎖のポリヌクレオチド配列、および前記で定義されるように、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下で、この相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列を含む。

【 0 1 0 1 】

用語「エピトープ」とは、本明細書中で使用される場合、動物において、好ましくは哺乳動物において、そして最も好ましくはヒトにおいて抗原性活性または免疫原性活性を有するポリペプチドの部分という。好ましい実施形態において、本発明は、エピトープを含むポリペプチド、およびこのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。「免疫原性エピトープ」とは、本明細書中で使用される場合、当該分野で公知の任意の方法によって決定されるような（例えば、下記に記載される抗体を産生するための方法による）、動物における抗体応答を誘発するタンパク質の一部として定義される（例えば、Geysenら、Proc

Nat l. Acad. Sci. USA 81 : 3998 - 4002 (1983) を参照のこと)。用語「抗原性エピトープ」とは、本明細書中で使用される場合、当該分野で周知の任意の方法（例えば、本明細書中に記載される免疫アッセイによる）によって決定されるような、抗体がその抗原に免疫特異的に結合し得るタンパク質の一部として定義される。免疫特異的結合は、非特異的結合は除外するが、他の抗原との交差反応を除外する必要はない。抗原性エピトープは、免疫原性である必要はない。

【 0 1 0 2 】

エピトープとして機能するフラグメントは、任意の従来の方法によって產生され得る。（例えば、Houghten, R. A., Proc. Nat l. Acad. Sci. USA 82 : 5131 - 5135 (1985) を参照のこと。これはさらに、米国特許第4, 631, 211号に記載される）。

【 0 1 0 3 】

本発明においては、抗原性エピトープは、好ましくは、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7アミノ酸配列を含み、より好ましくは、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50アミノ酸配列を含み、そして最も好ましくは約15アミノ酸と約30アミノ酸との間の配列を含む。免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープを含有する好ましいポリペプチドは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100アミノ酸残基の長さである。さらなる非排他的に好ましい抗原性エピトープは、本明細書中で開示される抗原性エピトープおよびその一部を含む。抗原性エピトープは、有用である（例えば、エピトープに特異的に結合する抗体（モノクローナル抗体を含む）を惹起するため）。好ましい抗原性エピトープは、本明細書中で開示される抗原性エピトープ、および2、3、4、5以上のこれらの抗原性エピトープの任意の組み合わせを含む。抗原性エピトープは、イムノアッセイにおいて、標的分子として使用され得る。（例えば、Wilsonら、Cell 37 : 767 -

778 (1984) ; Sutcliffeら、Science 219 : 660 - 666 (1983) を参照のこと)。

【0104】

同様に、免疫原性エピトープを使用して、例えば、当該分野で周知の方法に従う抗体を誘導し得る。(例えば、Sutcliffeら、前出; Wilsonら、前出; Chowら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 910 - 914 ; および Bittleら、J. Gen. Virol. 66 : 2347 - 2354 (1985) を参照のこと)。好ましい免疫原性エピトープは、本明細書で開示される免疫原性および2、3、4、5以上のこれらの免疫原性エピトープの任意の組合せを含む。1つ以上の免疫原性エピトープを含むポリペプチドは、キャリアタンパク質(例えば、アルブミン)とともに動物系(例えば、ウサギまたはマウス)に対する抗体応答を誘発するために提示され得るか、またはこのポリペプチドが十分に長い場合(少なくとも約25アミノ酸)、そのポリペプチドはキャリアなしで提示され得る。しかし、8~10個程度の少なさのアミノ酸を含む免疫原性エピトープは、少なくとも変性ポリペプチド中の直鎖状エピトープに結合し得る抗体を惹起するには十分であることが示されている(例えば、ウェスタンブロッティングにおいて)。

【0105】

本発明のエピトープ保有ポリペプチドは、当該分野で周知の方法に従って抗体を誘導するために使用され得る。これらの周知の方法としては、インビボ免疫、インビトロ免疫、およびファージディスプレイ法が挙げられるが、それらに限定されない。例えば、Sutcliffeら、前出; Wilsonら、前出、および Bittleら、J. Gen. Virol. 、66 : 2347 - 2354 (1985) を参照のこと。インビボ免疫を使用する場合、動物を、遊離ペプチドを用いて免疫し得る;しかし、抗ペプチド抗体力価は、高分子キャリア(例えば、キーホールリンベットヘモシアニン(KLH)または破傷風トキソイド)にペプチドを結合させることによりブーストされ得る。例えば、システイン残基を含むペプチドは、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)のようなリンカーを用いてキャリアに結合され得る。その一方、他のペ

プチドは、より一般的な結合剤（例えば、グルタルアルデヒド）を用いてキャリアに結合され得る。ウサギ、ラット、およびマウスのような動物は、遊離のペプチドまたはキャリア結合ペプチドのいずれかを用いて、例えば、約100 μ gのペプチドまたはキャリアタンパク質およびフロイントアジュバントまたは免疫応答を刺激することが公知である他のアジュバントを含むエマルジョンを腹腔内注射および／または皮内注射することにより免疫される。いくつかのブースター注射が、抗ペプチド抗体の有用な力価を提供するために、例えば、約2週間の間隔で、必要とされ得る。この力価は、例えば、固体表面に吸着した遊離のペプチドを用いるELISAアッセイにより検出され得る。免疫した動物由来の血清中の抗ペプチド抗体の力価は、抗ペプチド抗体の選択（例えば、当該分野で周知の方法に従う固体支持体上のペプチドへの吸着および選択された抗体の溶出による）により上昇し得る。

【0106】

当業者に理解されるように、そして上記で考察されるように、本発明のポリペプチドおよびその免疫原性エピトープフラグメントおよび／または抗原性エピトープフラグメントは、他のポリペプチド配列に融合され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、免疫グロブリン（IgA、IgE、IgG、IgM）の定常ドメインまたはそれらの部分（CH1、CH2、CH3、またはそれらの任意の組み合わせ、およびこれらの部分）と融合し得、これがキメラポリペプチドを生じる。このような融合タンパク質は、精製を容易にし得、そしてインビボにおける半減期を増加し得る。このことは、ヒトCD4ポリペプチドの最初の2つのドメインおよび哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質について示された。例えば、EP 394,827; Traunckerら、Nature, 331: 84-86 (1988)を参照のこと。上皮の閥門を横切った免疫系への抗原の増強された送達は、FcRn結合パートナー（例えば、IgGフラグメントまたはFcフラグメント（例えば、PCT公開WO96/22024およびWO 99/04813を参照のこと）に結合体化した抗原（例えば、インスリン）について実証されている。ジスルフィド架橋二量体構造を有するIgG融合タンパク質はまた、そのIg

G部分ジスルフィド結合に起因して、単量体ポリペプチドまたはそれらのフラグメント単独よりも、他の分子の結合および中和において効果的であることが見出された。例えば、Fountoulakisら、J. Biochem., 270 : 3958-3964 (1995) を参照のこと。

【 0 1 0 7 】

同様に、EP-A-O 464 533 (カナダ国対応出願2045869) は、別のヒトタンパク質またはその一部とともに免疫グロブリン分子の定常領域の種々の部分を含む、融合タンパク質を開示する。多くの場合、融合タンパク質中のFc部分は、治療および診断において有利であり、従って、例えば改善された薬物動態学的特性を生じ得る (EP-A 0232 262)。あるいは、融合タンパク質が発現、検出、および精製された後に、Fc部分が欠失され得ることが望ましい。例えば、融合タンパク質が、免疫の抗原として使用される場合、そのFc部分は、治療および診断を妨げ得る。薬物探索において、例えばhIL-5のようなヒトタンパク質が、hIL-5のアンタゴニストを同定するための高処理能力スクリーニングアッセイの目的のためにFc部分と融合されている。(D. Bennettら、J. Molecular Recognition 8 : 52-58 (1995) ; K. Johansonら、J. Biol. Chem. 270 : 9459-9471 (1995) を参照のこと。)

さらに、本発明のポリペプチドは、融合されたポリペプチドの精製を容易にするペプチドのような、マーカー配列と融合され得る。好ましい実施形態において、このマーカーアミノ酸配列は、とりわけ、pQEベクター (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) において提供されるタグのようなヘキサ-ヒスチジンペプチドであり、それらの多くは市販されている。例えば、Gentzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 821-824 (1989) に記載されるように、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。精製に有用な他のペプチドタグである「HA」タグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する (Wilsonら、Cell 37 : 767 (1984))。

【 0 1 0 8 】

従って、これら上記の任意の融合物は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを用いて操作され得る。

【 0 1 0 9 】

上記のエピトープをコードする核酸はまた、エピトープタグ（例えば、血球凝集素（「HA」）タグまたはフラッグタグ（flag tag））として目的の遺伝子と組換えられ、発現されたポリペプチドの検出および精製を補助し得る。例えば、Janknechtらによって記載された系は、ヒト細胞株において発現される非変性融合タンパク質の迅速な精製を可能にする（Janknechtら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-897 (1991)）。この系において、目的の遺伝子は、遺伝子の読み取り枠（リーディングフレーム）が、6つのヒスチジン残基からなるアミノ末端タグと翻訳で融合されるように、ワクシニア組換えプラスミド中にサブクローンされる。このタグは、融合タンパク質についての基質結合ドメインとしてはたらく。組換えワクシニアウイルスに感染した細胞由来の抽出物は、Ni²⁺ + ニトリロ三酢酸アガロースカラムに充填され、そしてヒスチジントグ化したタンパク質が、イミダゾール含有緩衝液を用いて選択的に溶出され得る。

【 0 1 1 0 】

本発明のさらなる融合タンパク質は、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリング、および／またはコドンシャッフリング（総称して「DNAシャッフリング」といわれる）の技術を通じて生成され得る。DNAシャッフリングを使用して、本発明のポリペプチドの活性を調節し得、このような方法を用いて、変化した活性を有するポリペプチド、ならびにそのポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを生成し得る。一般には、米国特許第5,605,793号；同第5,811,238号；同第5,830,721号；同第5,834,252号；および同第5,837,458号、ならびにPattemら、Curr. Opinion Biotechnol. 8: 724-33 (1997)；Harayama、Trends Biotechnol. 16 (2): 76-82 (1998)；Hanssonら、J. Mol. Bio

1. 287 : 265-76 (1999) ; ならびに Lorenzo および Blasco, Biotechniques 24 (2) : 308-13 (1998)

(これらの特許および刊行物の各々は、本明細書によってその全体が参考として援用される) を参照のこと。1つの実施形態において、配列番号Xに対応するポリヌクレオチドおよびこれらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの改変は、DNAシャッフリングにより達成され得る。DNAシャッフリングは、相同組換えまたは部位特異的組換えにより、2つ以上のDNAセグメントをアセンブリして、ポリヌクレオチド配列における変化を産生することを含む。別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドまたはコードされるポリペプチドは、組換え前に、エラープローンPCR、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法による、ランダムな変異誘発に供されることによって改変され得る。別の実施形態において、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの1つ以上の成分、モチーフ、セクション (section)、部分、ドメイン、フラグメントなどは、1つ以上の異種分子の1つ以上の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、フラグメントなどと組み換えられ得る。

【0111】

(ポリヌクレオチド改変体およびポリペプチド改変体)

本発明はまた、PTPase改変体を含む。本発明は、配列番号Xに開示されるポリヌクレオチド配列の改変体またはそれらに対する相補鎖の改変体、および/またはcDNAプラスミドV中に含まれるcDNA配列の改変体に関する。

【0112】

本発明はまた、配列番号Yに開示されるポリペプチド配列の改変体、配列番号Xのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド配列の改変体および/またはcDNAプラスミドV中のcDNAによってコードされるポリペプチド配列の改変体を含む。

【0113】

「改変体」とは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるがそれらの特性は保持している、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。一般的に、改変体は全体的に非常に類似しており、そして、多くの領域において、

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと同一である。

【 0 1 1 4 】

従って、本発明の1つの局面は、以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含むか、あるいは以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドからなる、単離された核酸分子を提供する：(a) 配列番号Xに記載されるヌクレオチド配列またはクローン番号VのcDNA配列に含まれるヌクレオチド配列；(b) 配列番号Yの完全アミノ酸配列をコードするかまたはクローン番号VのcDNAによってコードされる完全アミノ酸配列をコードする配列番号X中またはクローン番号VのcDNA中のヌクレオチド配列；(c) 成熟PTPaseポリペプチドをコードする配列番号X中またはクローン番号VのcDNA中のヌクレオチド配列；(d) PTPaseポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントをコードする、配列番号Xのヌクレオチド配列またはクローン番号VのcDNA配列；(e) PTPaseポリペプチドの抗原性フラグメントをコードする、配列番号Xのヌクレオチド配列またはクローン番号VのcDNA配列；(f) 配列番号Yの完全アミノ酸配列またはクローン番号VのcDNAによってコードされた完全アミノ酸配列を含むPTPaseポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(g) 配列番号Yのアミノ酸配列またはクローン番号VのcDNAによってコードされたアミノ酸配列の成熟PTPaseポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(h) 配列番号Yの完全アミノ酸配列またはクローン番号VのcDNAによってコードされた完全アミノ酸配列を有するPTPaseポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントをコードするヌクレオチド配列；(i) 配列番号Yの完全アミノ酸配列またはクローン番号VのcDNAによってコードされた完全アミノ酸配列を有するPTPaseポリペプチドの抗原性フラグメントをコードするヌクレオチド配列；ならびに(j) 上記の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、または(i)における任意のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列。

【 0 1 1 5 】

本発明はまた、例えば、に少なくとも80%、85%、90%、95%、96

%、97%、98%、99%または100%同一であるヌクレオチド配列を含むかまたはそれらからなる核酸分子に関する：上記の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)または(j)中の任意のヌクレオチド配列、クローン番号V中に含まれるcDNAの配列をコードするヌクレオチドまたはその相補鎖、配列番号Yのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、配列番号Xのヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列、配列番号Xのポリヌクレオチド配列の相補体によりコードされるポリペプチド配列、クローン番号Vに含まれるcDNAによってコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、表1の10列に規定されるポリペプチド配列をコードする配列番号Xのヌクレオチド配列またはその相補鎖、表1の10列に規定されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列またはその相補鎖、および／またはこれらの任意の核酸分子のポリヌクレオチドフラグメント（例えば、本明細書に記載のフラグメント）。これらの核酸分子に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下または低いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた、これらのポリヌクレオチドおよび核酸分子によってコードされるポリペプチドと同様に、本発明によって包含される。

【0116】

好ましい実施形態において、本発明は、これらのポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドがそうであるように、上記の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)または(i)中のポリヌクレオチドに、ストリンジェントな条件下または低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを含むかあるいはこのようなポリヌクレオチドからなる核酸分子、ならびにこれらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを包含する。別の好ましい実施形態において、これらの核酸分子の相補体にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下または低いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた、これらのポリヌクレオチドおよび核酸分子によってコードされるポリペプチドと同様に、本発明によって包含される。

【 0 1 1 7 】

別の実施形態において、本発明は、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはそれからなる、単離されたタンパク質を提供する：（a）配列番号Yの完全アミノ酸配列またはクローン番号VのcDNAによってコードされる完全アミノ酸配列；（b）配列番号Yのアミノ酸配列またはクローン番号Vによってコードされるアミノ酸配列を有するPTPaseポリペプチドの成熟形態のアミノ酸配列；（c）配列番号Yの完全アミノ酸配列またはクローン番号Vによってコードされる完全アミノ酸配列を有するPTPaseポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントのアミノ酸配列；ならびに（d）配列番号Yの完全アミノ酸配列またはクローン番号Vによりコードされる完全アミノ酸配列を有するPTPaseポリペプチドの抗原性フラグメントのアミノ酸配列。

【 0 1 1 8 】

本発明はまた、例えば、上記（a）、（b）、（c）、または（d）におけるアミノ酸配列、配列番号Yに示されるアミノ酸配列、クローン番号Vに含まれるcDNAによってコードされるアミノ酸配列、表1の10列目に規定されるアミノ酸配列、配列番号Xのヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、および配列番号Xのポリヌクレオチド配列の相補体によってコードされるアミノ酸配列のいずれかに少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、タンパク質に関する。これらのポリペプチドによってコードされるフラグメント（例えば、本明細書に記載のフラグメント）もまた提供される。これらのアミノ酸配列をコードする核酸分子の相補体に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるさらなるタンパク質もまた、本発明により包含され、同様に、これらのタンパク質をコードするポリヌクレオチドも、本発明により包含される。

【 0 1 1 9 】

本発明の参照ヌクレオチド配列に、例えば、少なくとも95%「同一」である

ヌクレオチド配列を有する核酸とは、その核酸のヌクレオチド配列が、そのヌクレオチド配列がポリペプチドをコードする参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチドあたり5つまでの点変異を含み得ることを除いて、参照配列に対して同一であることを意図する。換言すれば、参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を有する核酸を得るために、参照配列のヌクレオチドの5%までが、欠失され得るか、または別のヌクレオチドで置換され得るか、あるいは参照配列中の総ヌクレオチドの5%までの数のヌクレオチドが参照配列中に挿入され得る。問い合わせ (query) 配列は、表1に示される配列全体、ORF (オープンリーディングフレーム)、または本明細書中で記載されるように特定される任意のフラグメントであり得る。

[0 1 2 0]

実際問題として、任意の特定の核酸分子またはポリペプチドが、本発明のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか否かは、公知のコンピュータプログラムを使用して従来的に決定され得る。問い合わせ配列 (本発明の配列) と対象配列との間の最も良好な全体的な適合性 (全体的な配列整列とも呼ばれる) を決定するための好ましい方法は、Brutlagら (Comp. App. Bio sci. 6: 237-245 (1990)) のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを使用して決定され得る。配列整列において、問い合わせ配列および対象配列は、両方ともにDNA配列である。RNA配列は、UからTに変換することによって比較され得る。この全体的な配列整列の結果は、同一性パーセント (%) で示される。同一性パーセントを算定するためにDNA配列のFASTDB整列において使用される好ましいパラメーターは: Matrix=Unitary、k-tuple=4、Mismatch Penalty=1、Joining Penalty=30、Randomization Group Length=0、Cutoff Score=1、Gap Penalty=5、Gap Size Penalty 0.05、Window Size=500または対象ヌクレオチド配列の長さ (どちらかより短い方) である。

【 0 1 2 1 】

対象配列が、5' または 3' 欠失のために（内部欠失のためではなく）問い合わせ配列より短い場合、手動の補正が結果に対してなされなければならない。これは、同一性パーセントを計算する場合に、FASTDBプログラムが対象配列の5' および3' の短縮を考慮しないからである。5' 末端または3' 末端で短縮されている対象配列について、問い合わせ配列に対して、同一性パーセントは、問い合わせ配列の総塩基のパーセントとして一致／整列されない対象配列の5' および3' である問い合わせ配列の塩基の数を計算することによって補正される。ヌクレオチドが一致／整列されるか否かは、FASTDB配列整列の結果によって決定される。次いで、このパーセントは、特定のパラメーターを用いて上記のFASTDBプログラムによって算定された同一性パーセントから差し引かれ、最終的な同一性パーセントのスコアに到達する。この補正されたスコアが、本発明の目的に使用されるものである。FASTDB整列によって示されるように、問い合わせ配列と一致／整列されない、対象配列の5' および3' の塩基の外側の塩基のみが、同一性パーセントのスコアを手動で調整する目的で算定される。

【 0 1 2 2 】

例えば、90塩基の対象配列が、同一性パーセントを決定するために100塩基の問い合わせ配列に整列される。欠失が、対象配列の5' 末端で生じ、従って、FASTDB整列は、5' 末端の最初の10塩基で一致／整列を示さない。10個の不对合塩基は、配列の10%（一致していない5' および3' の末端の塩基の数／問い合わせ配列の塩基の総数）を表し、そのため10%が、FASTDBプログラムによって算定される同一性パーセントのスコアから差し引かれる。残りの90塩基が完全に一致する場合は、最終的な同一性パーセントは90%である。別の例では、90塩基の対象配列が、100塩基の問い合わせ配列と比較される。この場合、欠失は、内部欠失であり、その結果、対象配列の5' または3' に問い合わせと一致／整列しない塩基が存在しない。この場合、FASTDBによって算定される同一性パーセントは手動で補正されない。再び、問い合わせ配列と一致／整列しない対象配列の5' または3' の塩基のみが手動で補正さ

れる。他の手動の補正は、本発明の目的のためにはなされない。

【 0 1 2 3 】

本発明の問い合わせアミノ酸配列と少なくとも例えば95%「同一」であるアミノ酸配列を有するポリペプチドにより、対象ポリペプチドのアミノ酸配列は、その対象ポリペプチド配列が問い合わせアミノ酸配列の各100個のアミノ酸あたり5つまでのアミノ酸の変更を含み得ることを除いて、問い合わせ配列に同一であることが意図される。換言すれば、問い合わせアミノ酸配列に少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、対象配列におけるアミノ酸残基の5%までが、挿入、欠失、(インデル (i n d e l s)) または別のアミノ酸で置換され得る。参照配列のこれらの改変は、参照アミノ酸配列のアミノ末端位置もしくはカルボキシ末端位置で生じ得るか、またはそれらの末端位置の間のどこにでも、参照配列中の残基内で個々にかまたは参照配列内の1個以上連続する群の状態かのいずれかで散在して、生じ得る。

【 0 1 2 4 】

実際問題として、任意の特定のポリペプチドが、例えば、表1に示されるアミノ酸配列またはそのフラグメント、配列番号Xにおけるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列またはそのフラグメント、あるいはcDNAプラスミドVにおけるcDNAによりコードされるアミノ酸配列またはそのフラグメントに対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか否かは、公知のコンピュータープログラムを使用して従来のように決定され得る。問い合わせ配列(本発明の配列)と対象配列との間での最良の全体的な一致(グローバル配列アラインメントとも呼ばれる)を決定するための好ましい方法は、Brutlagら(Comp. App. Bio sci. 6: 237-245 (1990))のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータープログラムを使用して決定され得る。配列整列において、問い合わせ配列および対象配列は、両方ともヌクレオチド配列であるかまたは両方ともアミノ酸配列であるかのいずれかである。上記のグローバル配列アラインメントの結果は、同一性パーセントで示される。FASTDBアミノ酸整列に用いられる好ましいパラメーターは: Matrix = PAM 0、k-tuple = 2

Mismatch Penalty=1、Joining Penalty=20、Randomization Group Length=0、Cutoff Score=1、Window Size=配列の長さ、Gap Penalty=5、Gap Size Penalty=0.05、Window Size=500または対象アミノ酸配列の長さ（どちらかより短い方）である。

【 0 1 2 5 】

対象配列が、N末端欠失またはC末端欠失により（内部の欠失のためではなく）問い合わせ配列よりも短い場合、手動の補正が結果に対してなされなければならない。これは、FASTDBプログラムが、全体的な同一性パーセントを算定する場合に、対象配列のN末端短縮およびC末端短縮を考慮しないからである。問い合わせ配列に対して、N末端およびC末端で短縮されている対象配列について、同一性パーセントは、対応する対象残基と一致／整列しない、対象配列のN末端およびC末端にある問い合わせ配列の残基の数を、問い合わせ配列の総塩基のパーセントとして計算することによって補正される。残基が一致／整列されているか否かは、FASTDB配列整列の結果によって決定される。次いで、このパーセントは、上記のFASTDBプログラムによって特定のパラメーターを使用して計算された同一性パーセントから差し引かれ、最終的な同一性パーセントのスコアに到達する。この最終的な同一性パーセントのスコアが、本発明の目的で使用されるものである。問い合わせ配列と一致／整列していない対象配列のN末端側およびC末端側の残基のみが、同一性パーセントのスコアを手動で調整する目的のために考慮される。すなわち、対象配列の最も遠いN末端およびC末端の残基の外側の問い合わせ残基位置のみである。

【 0 1 2 6 】

例えば、90アミノ酸残基の対象配列が、同一性パーセントを決定するために100残基の問い合わせ配列と整列される。その欠失は対象配列のN末端に存在し、そしてそれゆえそのFASTDB整列は、N末端の最初の10残基の一致／整列を示さない。この10個の不对合残基は、その配列の10%（一致していないN末端およびC末端の残基の数／問い合わせ配列中の残基の総数）を表し、そ

の結果FASTDBプログラムによって計算された同一性パーセントのスコアから10%が差し引かれる。残りの90残基が完全に一致した場合、最終的な同一性パーセントは90%である。別の例において、90残基の対象配列が、100残基の問い合わせ配列と比較される。この場合、その欠失は内部欠失であり、そのため問い合わせ配列と一致／整列しない対象配列のN末端またはC末端の残基は存在しない。この場合、FASTDBによって算定される同一性パーセントは、手動で補正されない。再び、FASTDB整列において示される、問い合わせ配列と一致／整列しない対象配列のN末端およびC末端の外側の残基位置のみが手動で補正される。他の手動の補正は、本発明の目的のためにはなされない。

【0127】

改変体は、コード領域、非コード領域、またはその両方における変化を含み得る。特に好ましいものは、サイレントな置換、付加、または欠失を生成するがコードされるポリペプチドの特性または活性を変化させない変化を含む、ポリヌクレオチド改変体である。遺伝コードの縮重に起因するサイレントな置換によって生成されるヌクレオチド改変体が、好ましい。さらに、50アミノ酸未満、40アミノ酸未満、30アミノ酸未満、20アミノ酸未満、10アミノ酸未満、あるいは5～50アミノ酸、5～25アミノ酸、5～10アミノ酸、1～5アミノ酸、または1～2アミノ酸が、任意の組合せで置換、欠失、または付加されている改変体もまた、好ましい。ポリヌクレオチド改変体は、種々の理由（例えば、特定の宿主についてのコドン発現を至適化する（ヒトmRNAにおけるコドンをも、E. coliのような細菌宿主によって好ましいコドンに変化させる））のために、生成され得る。

【0128】

天然に存在する改変体は、「対立遺伝子改変体」と呼ばれ、そして生物の染色体上の所定の遺伝子座を占有する遺伝子のいくつかの代替の形態のうちの1つをいう。（Genes II, Lewin, B. 編 John Wiley & Sons, New York (1985)）。これらの対立遺伝子改変体は、ポリヌクレオチドレベルおよび／またはポリペプチドレベルのいずれかで変化し得、そして本発明に含まれる。あるいは、天然に存在しない改変体は、変異誘発技

術によってかまたは直接的な合成によって、生成され得る。

【 0 1 2 9 】

タンパク質工学および組換えDNA技術の公知の方法を使用して、改変体は、本発明のポリペプチドの特性を改善または変化させるように作製され得る。例えば、本明細書中に考察されるように、1つ以上のアミノ酸が、生物学的機能の実質的な欠損を伴わずに、本発明のポリペプチドのN末端またはC末端から欠失され得る。Ronら、J. Biol. Chem. 268:2984-2988 (1993)の著者らは、3個、8個、または27個のアミノ末端アミノ酸残基を欠失させた後でさえもヘパリン結合活性を有する改変体KGFタンパク質を報告した。同様に、インターフェロン γ は、このタンパク質のカルボキシ末端から8~10個のアミノ酸残基を欠失させた後、10倍までのより高い活性を示した(Dobeliら、J. Biotechnology 7:199-216 (1988))。

【 0 1 3 0 】

さらに、豊富な証拠は、改変体が、天然に存在するタンパク質の生物学的活性に類似する活性をしばしば保持することを実証する。例えば、Gayleおよび共同研究者ら(J. Biol. Chem. 268:22105-22111 (1993))は、ヒトサイトカインIL-1aの広範囲にわたる変異分析を行った。彼らは、ランダムな変異誘発を使用して、分子の全長にわたって改変体当たり平均2.5アミノ酸の変化になる、3,500個を超える個々のIL-1a改変体を作製した。複数の変異が、全ての潜在的なアミノ酸の位置で試験された。この研究者らは、「分子の大部分は、[結合活性または生物学的活性]のいずれに対してもほとんど影響を伴わないで変化され得る」ことを見出した。(要約を参照のこと)。実際、試験された3,500個を超えるヌクレオチド配列のうち、わずか23個の独特なアミノ酸配列が、野生型と活性が有意に異なるタンパク質を生成した。

【 0 1 3 1 】

さらに、本明細書において記載されるように、ポリペプチドのN末端またはC末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失が、1つ以上の生物学的機能の改変または

欠失を生じたとしても、他の生物学的活性はなお保持され得る。例えば、分泌形態を認識する抗体を誘導および／または結合する、欠失改変体の能力は、分泌形態の大多数より少ない残基が、N末端またはC末端から除去される場合に保持されるようである。タンパク質のN末端またはC末端残基を欠損する特定のポリペプチドが、このような免疫原性活性を保持するか否かは、本明細書中に記載される慣用的な方法、およびそうでなければ当該分野において公知の慣用的な方法によって容易に決定され得る。

【 0 1 3 2 】

従って、本発明はさらに、本発明のポリペプチドの機能的な活性（例えば、生物学的活性）を示すポリペプチド改変体（これは、本発明のポリペプチドの改変体である）を含む。このような改変体としては、活性に対する影響をほとんど有さないように、当該分野において公知の一般的な法則に従って選択される、欠失、挿入、逆位、反復、および置換が挙げられる。

【 0 1 3 3 】

本出願は、本明細書中に開示される核酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97、98%、99%または100%同一の核酸分子（例えば、N末端欠失および／C末端欠失のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする）に関し、それらが機能的活性を有するポリペプチドをコードするかどうかに関わらない。これは、特定の核酸分子が機能的活性を有するポリペプチドをコードしない場合でさえ、当業者は、例えば、ハイブリダイゼーションプローブまたはポリメラーゼ鎖反応（PCR）プライマーとして核酸分子をどのようにして使用するかを依然として知っているからである。機能的活性を有するポリペプチドをコードしない本発明の核酸分子の使用としては、特に、以下が挙げられる：（1）cDNAライブラリー内で遺伝子または対立遺伝子改変体またはそれらのスプライス改変体を単離する工程；（2）Vermaら、Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988)に記載されるような、遺伝子の正確な染色体位置を提供するための、中期染色体スプレッドに対するインサイチュハイブリダイゼーション（例えば、「FISH

」) ; および (3) 特定の組織内で mRNA 発現を検出するためのノーザンブロット分析。

【 0 1 3 4 】

しかし、本明細書中に開示される核酸配列に対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一の配列を有する核酸分子であって、実際に本発明のポリペプチドの機能的活性を有するポリペプチドをコードするものが、が好ましい。

【 0 1 3 5 】

当然のことながら、遺伝子コードの縮重に起因して、例えば、cDNA プラスミド V 中の cDNA の核酸配列、表 1 (配列番号 X) に示される核酸配列またはそのフラグメントに対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一の配列を有する多数の核酸分子が、「機能的活性を有する」ポリペプチドをコードするということを、当業者は、直ちに理解する。実際に、これらのヌクレオチド配列のいずれかの縮重改変体すべてが、同じポリペプチドをコードするので、多くの場合、このことは、上記の比較アッセイを実行しなくても、当業者に明らかである。縮重改変体でないそのような核酸分子について、妥当な数がまた、機能的活性を有するポリペプチドをコードすることが、当該分野でさらに認識される。これは、当業者が、さらに以下に記載されるように、タンパク質機能に有意に影響する可能性が低いかまたは影響しそうでないアミノ酸置換 (例えば、1つの脂肪族アミノ酸を第2の脂肪族アミノ酸と置換すること) を完全に知っているからである。

【 0 1 3 6 】

例えば、表現型的にサイレントなアミノ酸置換の作製方法に関する手引きは、Bowieら、「Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions」, Science 247: 1306-1310 (1990) において提供され、この中でこの著者らは、アミノ酸配列が変化することに対する許容性を研究するための2つの主なストラテジーが存在することを示す。

【 0 1 3 7 】

第1のストラテジーは、進化の過程の間の自然の選択によるアミノ酸置換の許容性を利用する。異なる種におけるアミノ酸配列を比較して、保存されたアミノ酸が同定され得る。これらの保存されたアミノ酸は、タンパク質の機能について重要である可能性がある。対照的に、置換が自然の選択によって許容されたアミノ酸の位置は、これらの位置がタンパク質の機能に重要ではないことを示す。従って、アミノ酸置換を許容する位置は、タンパク質の生物学的活性をなおも維持しつつ改変され得る。

【 0 1 3 8 】

第2のストラテジーは、タンパク質機能に重要な領域を同定するために、クローン化された遺伝子の特定の位置でアミノ酸変化を導入するための遺伝子工学を使用する。例えば、部位特異的変異誘発またはアラニンスキャニング変異誘発（分子中のすべての残基に1つのアラニン変異の導入）が、使用され得る。（C u n n i n g h a m および W e l l s , S c i e n c e 244 : 1081 - 1085 (1989)）。次いで、得られた変異体分子は、生物学的活性について試験され得る。

【 0 1 3 9 】

著者らが言及するように、これらの2つのストラテジーは、タンパク質がアミノ酸置換を驚くほど許容することを明らかにした。著者らはさらに、どのアミノ酸変化が、タンパク質中の特定のアミノ酸位置で許容されるようであることを示す。例えば、（タンパク質の三次構造内に）ほとんど埋もれているアミノ酸残基は、非極性側鎖を必要とするが、表面側鎖の特徴は、一般にほとんど保存されない。さらに、許容される保存的アミノ酸置換は、脂肪族または疎水性のアミノ酸である A l a、V a l、L e u、および I l e の置換；ヒドロキシル残基である S e r および T h r の置換；酸性残基である A s p および G l u の置換；アミド残基である A s n および G l n の置換、塩基性残基である L y s、A r g、および H i s の置換；芳香族残基である P h e、T y r、および T r p の置換、ならびに小さなサイズのアミノ酸である A l a、S e r、T h r、M e t、および G l y の置換を含む。保存的アミノ酸置換に加えて、本発明の改変体は、（i）非保

存的アミノ酸残基のうちの1つ以上での置換（置換されるアミノ酸残基は、遺伝コードによってコードされるアミノ酸残基であってもよく、もしくはそうでなくてもよい）、または（i i）置換基を有する1つ以上のアミノ酸残基での置換、または（i i i）別の化合物（例えば、ポリペプチドの安定性および／もしくは可溶性を増加するための化合物（例えば、ポリエチレングリコール））との成熟ポリペプチドの融合、または（i v）さらなるアミノ酸（例えば、I g G F c 融合領域ペプチド、またはリーダー配列もしくは分泌配列、または精製を容易にする配列のような）とのポリペプチドの融合、または（v）アルブミン（組み換えアルブミンを含むがこれに限定されないのような別の化合物とのこのポリペプチドの融合を含む（例えば、その全体が参考として本明細書に援用される、1999年3月2日発行の米国特許番号第5,876,969号、欧州特許番号第0413622号、および1998年6月16日発行の米国特許番号第5,766,883号を参照のこと）。このような改変体ポリペプチドは、本明細書中の教示から、当業者の範囲内であると考えられる。

【0140】

例えば、他の荷電アミノ酸または中性のアミノ酸での荷電アミノ酸のアミノ酸置換を含むポリペプチド改変体は、改善された特性（例えば、より少ない凝集性）を有するタンパク質を生成し得る。薬学的処方物の凝集は、凝集体の免疫原性活性に起因して、活性の減少およびクリアランスの増加の両方をもたらす。（P i n c k a r d ら、C l i n . E x p . I m m u n o l . 2 : 3 3 1 - 3 4 0 （1967）；R o b b i n s ら、D i a b e t e s 3 6 : 8 3 8 - 8 4 5 （1987）；C l e l a n d ら、C r i t . R e v . T h e r a p e u t i c D r u g C a r r i e r S y s t e m s 1 0 : 3 0 7 - 3 7 7 （1993））。

【0141】

本発明のさらなる実施形態は、少なくとも1つであるが、50個以下のアミノ酸置換、さらにより好ましくは40個以下のアミノ酸置換、なおより好ましくは30個以下のアミノ酸置換、そしてなおさらにより好ましくは20個以下のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドのアミノ酸配列を含む、ポリ

ペプチドに関する。もちろん、ポリペプチドが、配列番号 Y のポリペプチドのアミノ酸配列、配列番号 X によってコードされるアミノ酸配列、および／または cDNA プラスミド V 中の cDNA によってコードされるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有することが非常に好ましく、好ましさの増大する順番に、これは、少なくとも 1 つであるが、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または 1 個以下である、アミノ酸置換を含む。特定の実施形態において、配列番号 Y のアミノ酸配列またはそのフラグメント（例えば、本明細書に記載の成熟形態および／または他のフラグメント）、配列番号 X によってコードされるアミノ酸配列またはそのフラグメント、ならびに／あるいは cDNA プラスミド V によってコードされるアミノ酸配列またはそのフラグメントにおける付加、置換、および／または欠失の数は、1～5、5～10、5～25、5～50、10～50、または 50～150 であり、保存的アミノ酸置換が好ましい。本明細書中で議論されるように、本発明の任意のポリペプチドは、融合タンパク質を生成するために使用され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、第 2 のタンパク質と融合される場合、抗原性タグとして使用され得る。本発明のポリペプチドに対して惹起される抗体は、そのポリペプチドに結合することによって、第 2 のタンパク質を間接的に検出するために使用され得る。さらに、分泌タンパク質は、細胞位置を輸送シグナルに基づいて標的化するので、分泌されることが示される本発明のポリペプチドは、他のタンパク質に一旦融合されると標的化分子として使用され得る。

【 0 1 4 2 】

本発明のポリペプチドと融合され得るドメインの例は、異種シグナル配列のみならず、また他の異種機能性領域をも含む。融合は、必ずしも直接的である必要はないが、リンカー配列を介して起こり得る。

【 0 1 4 3 】

特定の好ましい実施形態において、本発明のタンパク質は、ポリペプチドが N 末端欠失改変体および／または C 末端欠失改変体である、融合タンパク質を含む。好ましい実施形態において、本出願は、特定の N 末端欠失改変体および C 末端欠失改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列に対して少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 9

9 % 同一の核酸分子に関する。これらのポリペプチド（フラグメントおよび／または改変体を含む）をコードするポリヌクレオチドもまた、本発明によって包含される。

【 0 1 4 4 】

さらに、融合タンパク質はまた、本発明のポリペプチドの特徴を改良するために操作され得る。例えば、さらなるアミノ酸（特に荷電アミノ酸）の領域が、宿主細胞からの精製または続く取り扱いおよび貯蔵の間の安定性および持続性を改良するためにポリペプチドのN末端へ付加され得る。また、ペプチド部分が、精製を容易にするためにポリペプチドへ付加され得る。このような領域は、ポリペプチドの最終調製の前に除去され得る。ポリペプチドの取り扱いを容易にするためのペプチド部分の付加は、当該分野でよく知られる慣用的技術である。

【 0 1 4 5 】

当業者に理解されるように、上記の本発明のポリペプチドおよびそのエピトープ保有フラグメントは、異種ポリペプチド配列と連結させられ得る。例えば、本発明のポリペプチドは、異種ポリペプチド配列と融合され得、例えば、本発明のポリペプチドは、免疫グロブリン（I g A、I g E、I g G、I g M）の定常ドメインまたはそれらの部分（C H 1、C H 2、C H 3、またはそれらの任意の組み合わせ（それらのドメイン全体および部分の両方を含む）と融合され得、キメラポリペプチドを生じる。これらの融合タンパク質は、精製を容易にし、そしてインビボでの半減期の増大を示す。1つの報告された例は、ヒトC D 4 -ポリペプチドの最初の2つのドメインおよび哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質を記載する。（E P A 3 9 4, 8 2 7 ; T r a u n e c k e r ら、N a t u r e, 3 3 1 : 8 4 ~ 8 6 (1 9 8 8) ）。（I g G 部分に起因する）ジスルフィド結合二量体構造を有する融合タンパク質はまた、単量体タンパク質またはタンパク質のフラグメント単独よりも、他の分子の結合および中和において効率的であり得る（F o u n t o u l a k i s ら、J . B i o c h e m . , 2 7 0 : 3 9 5 8 - 3 9 6 4 (1 9 9 5) ）。

【 0 1 4 6 】

(ベクター、宿主細胞、およびタンパク質産生)

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、宿主細胞、および組換え技術によるポリペプチドの産生に関連する。例えば、ベクターは、ファージベクター、プラスミドベクター、ウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターであり得る。レトロウイルスベクターは、複製コンピテントであってもまたは複製欠損であってもよい。後者の場合、ウイルス増殖は一般的に、補完性 (c o m p l e m e n t i n g) 宿主細胞においてのみ生じる。

【 0 1 4 7 】

本発明のポリヌクレオチドは、宿主における増殖のための選択マーカを含むベクターに連結され得る。一般に、プラスミドベクターが、リン酸カルシウム沈澱物のような沈澱物、または荷電脂質との複合体において、導入される。ベクターがウイルスである場合、このベクターは、適切なパッケージング細胞株を使用してインビトロでパッケージングされ、次いで宿主細胞に形質導入され得る。

【 0 1 4 8 】

ポリヌクレオチド挿入物は、適切なプロモーター (いくつか挙げれば、例えば、ファージλ P L プロモーター、E. c o l i l a c プロモーター、t r p プロモーター、p h o A プロモーターおよび t a c プロモーター、S V 4 0 初期プロモーターおよび S V 4 0 後期プロモーター、ならびにレトロウイルス L T R のプロモーター) に作動可能に連結されるべきである。他の適切なプロモーターは当業者に公知である。発現構築物はさらに、転写開始のための部位、転写終結のための部位、および転写領域において、翻訳のためのリボソーム結合部位を含む。この構築物によって発現される転写物のコード部分は、好ましくは、始めに翻訳開始コドンを含み、そして翻訳されるべきポリペプチドの末端に適切に位置する終結コドン (U A A 、 U G A または U A G) を含む。

【 0 1 4 9 】

示されるように、発現ベクターは、好ましくは少なくとも1つの選択マーカを含む。このようなマーカは、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸レダクターゼ、G 4 1 8 耐性遺伝子、またはネオマイシン耐性遺伝子、ならびに E. c o l i および他の細菌において培養するためのテトラサイクリン耐性遺伝子、カナマ

イシン耐性遺伝子またはアンピシリン耐性遺伝子を含む。適切な宿主の代表的な例は、細菌細胞（例えば、*E. coli*、*Streptomyces*細胞および *Salmonella typhimurium*細胞）；真菌細胞（例えば、酵母細胞（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*または *Pichia pastoris*（ATCC受託番号201178）））；昆虫細胞（例えば *Drosophila* S2細胞および *Spodoptera Sf9*細胞）；動物細胞（例えば、CHO細胞、COS細胞、293細胞、および Bowesメラノーマ細胞）；ならびに植物細胞を含むが、これらに限定されない。上記の宿主細胞のための適切な培養培地および条件は、当該分野で公知である。

【0150】

細菌における使用のために好ましいベクターの中には、pQE70、pQE60およびpQE-9（QIAGEN, Inc. から入手可能）；pBluescriptベクター、Phagescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A（Stratagene Cloning Systems, Inc. から入手可能）；およびptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5（Pharmacia Biotech, Inc. から入手可能）を含む。好ましい真核生物ベクターの中には、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG（Stratageneから入手可能）；ならびにpSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL（Pharmaciaから入手可能）がある。酵母系における使用のために好ましい発現ベクターとしては、pYES2、pYD1、pTEF1/Zeo、pYES2/GS、pPICZ、pGAPZ、pGAPZalph、pPIC9、pPIC3.5、pHIL-D2、pHIL-S1、pPIC3.5K、pPIC9K、およびPAO815（全てが、Invitrogen, Carlsbad, CAから入手可能）が挙げられるがこれらに限定されない。他の適切なベクターは、当業者に容易に明らかである。

【0151】

宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DE

A Eーデキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染、または他の方法によってもたらされ得る。このような方法は、Davisら、Basic Methods In Molecular Biology (1986) のような多くの標準的実験マニュアルに記載される。本発明のポリペプチドが、実際、組換えベクターを欠損する宿主細胞によって発現され得ることが特に意図される。

【 0 1 5 2 】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウム沈澱またはエタノール沈澱、酸抽出、陰イオン交換クロマトグラフィーまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって、組換え細胞培養物から回収され得るそして精製され得る。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）が精製のために使用される。

【 0 1 5 3 】

本発明のポリペプチドはまた、以下から回収され得る：直接単離されるかまたは培養されるかにかかわらず、天然の供給源（体液、組織および細胞を含む）から精製された産物；化学的合成手順の産物；ならびに、原核生物宿主または真核生物宿主（例えば、細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞を含む）から組換え技術によって産生された産物。組換え産生手順に使用される宿主に依存して、本発明のポリペプチドは、グリコシル化されてもまたはグリコシル化されていなくてもよい。さらに、本発明のポリペプチドはまた、宿主媒介プロセスの結果として、いくつかの場合において、最初の修飾メチオニン残基を含み得る。従って、一般に、翻訳開始コドンによってコードされるN末端メチオニンが、すべての真核生物細胞における翻訳後のどのタンパク質からも高い効率で除去されることは当該分野において周知である。ほとんどのタンパク質においてN末端メチオニンもまた、ほとんどの原核生物において効率的に除去されるが、いくつかのタンパク質について、この原核生物除去プロセスは、N末端メチオニンが共有結合するアミノ酸の性質に依存し、非効率的である。

【0154】

1つの実施形態において、酵母 *Pichia pastoris* は、真核細胞系において、本発明のポリペプチドを発現させるために使用される。*Pichia pastoris* は、メタノールをその唯一の炭素源として代謝し得るメチロトロフ酵母である。メタノール代謝経路における主要な工程は、 O_2 を使用する、メタノールからホルムアルデヒドへの酸化である。この反応は、酵素アルコールオキシダーゼによって触媒される。その唯一の炭素源としてメタノールを代謝するために、*Pichia pastoris* は、 O_2 に対するアルコールオキシダーゼの比較的低い親和性に部分的に起因して、高レベルのアルコールオキシダーゼを生成しなければならない。結果的に、主要な炭素源としてメタノールに依存する増殖培地において、2つのアルコールオキシダーゼ遺伝子のうちの1つ(AOX1)のプロモーター領域は、非常に活性である。メタノールの存在下で、AOX1遺伝子から産生されるアルコールオキシダーゼは、*Pichia pastoris* における総可溶性タンパク質のうちのおよそ30%までを含む。Ellis, S. B. ら、Mol. Cell. Biol. 5:1111~21(1985); Koutz, P. J. ら、Yeast 5:167~77(1989); Tschopp, J. F. ら、Nucl. Acids Res. 15:3859~76(1987)を参照のこと。従って、AOX1調節配列の全てまたは一部の転写調節下の異種コード配列(例えば、本発明のポリヌクレオチドなど)は、メタノールの存在下で増殖した*Pichia* 酵母において、極めて高レベルで発現される。

【0155】

1つの例において、プラスミドベクター pPIC9K は、「*Pichia Protocols: Methods in Molecular Biology*」, D. R. Higgins および J. Cregg 編 (The Humana Press, Totowa, NJ, 1998) において本質的に記載されるように、*Pichia* 酵母系において、本明細書中に示されるような本発明のポリペプチドをコードするDNAを発現させるために使用される。この発現ベクターは、マルチクロニング部位の上流に位置する *Pichia pastoris*

アルカリホスファターゼ (P H O) 分泌シグナルペプチド (すなわち、リーダー) に連結された強力な A O X 1 プロモーターの効力によって、本発明のポリペプチドの発現および分泌を可能にする。

【 0 1 5 6 】

多くの他の酵母ベクター (例えば、 p Y E S 2、p Y D 1、p T E F 1 / Z e o、p Y E S 2 / G S、p P I C Z、p G A P Z、p G A P Z α 、p P I C 9、p P I C 3. 5、p H I L - D 2、p H I L - S 1、p P I C 3. 5 K、および P A O 8 1 5) は、当業者が容易に理解するように、提案された発現構築物が転写、翻訳、分泌 (所望される場合) などのために適切に配置されたシグナル (必要とされる場合インフレームの A U G を含む) を提供する限り、p P I C 9 K の代わりに使用され得る。

【 0 1 5 7 】

別の実施形態において、異種コード配列 (例えば、本発明のポリヌクレオチドなど) の高レベルの発現は、本発明の異種ポリヌクレオチドを発現ベクター (例えば、p G A P Z または p G A P Z α など) 中にクローニングし、そしてメタノールの非存在下で酵母培養物を増殖させることによって達成され得る。

【 0 1 5 8 】

本明細書において議論されるベクター構築物を含む宿主細胞を含むことに加えて、本発明はまた、脊椎動物起源 (特に、哺乳動物起源) の一次 (p r i m a r y) 宿主細胞、二次 (s e c o n d a r y) 宿主細胞、および不死化宿主細胞を含む。これらの宿主細胞は、内因性の遺伝物質 (例えば、コード配列) を欠失または置換するように操作されており、そして / あるいは本発明のポリヌクレオチドと作動可能に連結されておりかつ内因性のポリヌクレオチドを活性化、変更、および / または増幅する遺伝物質 (例えば、異種ポリヌクレオチド配列) を含むように操作されている。例えば、当該分野で公知の技術は、相同組換えを介して、異種制御領域 (例えば、プロモーターおよび / またはエンハンサー) ならびに内因性ポリヌクレオチド配列を作動可能に連結するために使用され得る (例えば、1997年6月24日に発行された米国特許番号第5, 641, 670号; 1996年9月26日に公開された国際公開番号第W O 96 / 29411号; 1

994年8月4日に公開された国際公開番号第WO 94/12650号; Kollerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); および Zijlstraら, Nature 342:435-438 (1989) (これらの各々の開示は、それら全体が参考として援用される) を参照のこと)。

【0159】

さらに、本発明のポリペプチドは、当該分野で公知の技術を用いて化学合成され得る (例えば、Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N. Y. および Hunkapillerら, Nature, 310:105-111 (1984) を参照のこと)。例えば、ポリペプチドのフラグメントに対応するポリペプチドは、ペプチド合成機の使用により合成され得る。さらに、所望の場合、非古典的アミノ酸または化学的アミノ酸アナログが、置換または付加としてこのポリペプチド配列に導入され得る。非古典的アミノ酸としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: 通常のアミノ酸のD異性体、2, 4-ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナーアミノ酸 (例えば、 β -メチルアミノ酸)、Ca-メチルアミノ酸、Na-メチルアミノ酸、および一般のアミノ酸アナログ。さらに、アミノ酸はD (右旋性) またはL (左旋性) であり得る。

【0160】

本発明は、翻訳の間または翻訳後に、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、抗体分子または他の細胞性リガンドへの結合などによって示差的に改変された本発明のポリペプチドを含む。多数の化学的改変のいずれもが、以下を

含むがこれらに限定されない公知の技術によって実施され得る：臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、 NaBH_4 による特異的化学的切断；アセチル化、ホルミル化、酸化、還元；ツニカマイシンの存在下での代謝合成；など。

【 0 1 6 1 】

本発明によって含まれるさらなる翻訳後修飾としては、例えば、以下などが挙げられる：N結合型もしくはO結合型の等鎖（N末端またはC末端のプロセッシング）、アミノ酸骨格への化学部分の結合、N結合型もしくはO結合型の等鎖の化学修飾、および原核生物宿主細胞発現の結果としてのN末端メチオニン残基の付加もしくは欠失。このポリペプチドはまた、検出可能な標識（例えば、酵素標識、蛍光標識、同位体標識または親和性標識）を用いて改変して、このタンパク質の検出および単離が可能にされ得る。

【 0 1 6 2 】

本発明によってまた、さらなる利点（例えば、このポリペプチドの溶解度、安定性および循環時間の増加、または免疫原性の減少）を提供し得る、本発明のポリペプチドの化学修飾誘導体が提供される（米国特許番号第4, 179, 337号を参照のこと）。誘導体化のための化学部分は、水溶性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなど）から選択され得る。このポリペプチドは、この分子内のランダムな位置で、またはこの分子内の所定の位置で改変され得、そして1、2、3個以上の結合した化学部分を含み得る。

【 0 1 6 3 】

このポリマーは、任意の分子量であり得、そして分枝状であっても非分枝状であってもよい。ポリエチレングリコールに関しては、好ましい分子量は、取り扱いおよび製造の容易さのために、約1 kDaと約100 kDaとの間（用語「約」は、ポリエチレングリコールの調製において、いくつかの分子は示した分子量よりも重く、いくつかは示した分子量よりも軽いことを、示す）である。所望の治療的プロファイル（例えば、所望される徐放の持続時間、存在する場合は生物

学的活性に対する効果、取り扱いの容易さ、抗原性の程度または抗原性がないこと、および治療タンパク質またはアナログに対するポリエチレングリコールの他の公知の効果)に依存して、他のサイズが用いられ得る。

【 0 1 6 4 】

ポリエチレングリコール分子(または他の化学的部分)は、このタンパク質の機能的ドメインまたは抗原性ドメインに対する効果を考慮してタンパク質に結合されるべきである。当業者に利用可能な多数の結合方法が存在する(例えば、本明細書中に参考として援用される、EP 0 401 384 (G-CSFにPEGを結合する)、Malikら, Exp. Hematol. 20:1028-1035 (1992) (塩化トレスルを用いたGM-CSFのペグ化を報告する)もまた参照のこと)。例えば、ポリエチレングリコールは、反応性基(例えば、遊離のアミノ基またはカルボキシル基)によってアミノ酸残基を介して共有結合され得る。反応性基は、活性化ポリエチレングリコール分子が結合し得る基である。遊離のアミノ基を有するアミノ酸残基としては、リジン残基およびN末端アミノ酸残基が挙げられ得る; 遊離のカルボキシル基を有するアミノ酸残基としては、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基およびC末端アミノ酸残基が挙げられ得る。スルフヒドリル残基もまた、ポリエチレングリコール分子を結合するための反応性基として用いられ得る。治療目的のために好ましいのは、アミノ基での結合(例えば、N末端またはリジン基での結合)である。

【 0 1 6 5 】

具体的には、N末端で化学修飾されたタンパク質を所望し得る。ポリエチレングリコールを本発明の組成の例示として用いて、種々のポリエチレングリコール分子から(分子量、分枝などによって)、反応混合物中でのポリエチレングリコール分子のタンパク質(ポリペプチド)分子に対する比、行われるべきペグ化反応の型、および選択されたN末端ペグ化タンパク質の獲得方法を選択し得る。N末端ペグ化調製物の獲得方法(すなわち、必要な場合、この部分を他のモノペグ化部分から分離すること)は、ペグ化タンパク質分子の集団からの、N末端ペグ化物質の精製により行われ得る。N末端修飾で化学修飾された選択的タンパク質は、特定のタンパク質における誘導体化に利用可能な異なる型の第1級アミノ基

(リジン対N末端)の示差的反応性を利用する還元的アルキル化によって達成され得る。適切な反応条件下では、カルボニル基含有ポリマーを用いた、N末端でのタンパク質の実質的に選択的な誘導体化が達成される。

【 0 1 6 6 】

本発明のポリペプチドは、単量体または多量体（すなわち、二量体、三量体、四量体およびより高度の多量体）であり得る。従って、本発明は、単量体および多量体の本発明のポリペプチド、それらの調製ならびにそれらを含む組成物（好ましくは治療薬）に関する。特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、単量体、二量体、三量体または四量体である。さらなる実施形態では、本発明の多量体は、少なくとも二量体、少なくとも三量体、または少なくとも四量体である。

【 0 1 6 7 】

本発明によって含まれる多量体は、ホモマーまたはヘテロマーであり得る。本明細書中で用いられる場合、用語ホモマーは、配列番号Yのアミノ酸配列に対応するかまたは配列番号Xによってコードされるアミノ酸配列または配列番号Xの相補体、および／またはcDNAプラスミドVによってコードされるアミノ酸配列（本明細書中に記載されるこれらに対応する、フラグメント、改変体、スプライス改変体および融合タンパク質を含む）のみを含む多量体をいう。これらのホモマーは、同一または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み得る。特定の実施形態では、本発明のホモマーは、同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドのみを含む多量体である。別の特定の実施形態では、本発明のホモマーは、異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む多量体である。特定の実施形態では、本発明の多量体は、ホモ二量体（例えば、同一または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む）あるいはホモ三量体（例えば、同一および／または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む）である。さらなる実施形態では、本発明のホモマー性多量体は、少なくともホモ二量体、少なくともホモ三量体または少なくともホモ四量体である。

【 0 1 6 8 】

本明細書中で用いられる場合、用語ヘテロマーとは、本発明のポリペプチドに

加えて、1つ以上の異種ポリペプチド（すなわち、異なるタンパク質のポリペプチド）を含む多量体をいう。特定の実施形態では、本発明の多量体は、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体またはヘテロ四量体である。さらなる実施形態では、本発明のヘテロマー性多量体は、少なくともヘテロ二量体、少なくともヘテロ三量体または少なくともヘテロ四量体である。

【 0 1 6 9 】

本発明の多量体は、疎水性、親水性、イオン性および／もしくは共有結合性の結合の結果であり得、ならびに／または例えば、リボソーム形成によって間接的に連結され得る。従って、1つの実施形態では、本発明の多量体（例えば、ホモ二量体またはホモ三量体など）は、本発明のポリペプチドが溶液中で互いに接触する場合に形成される。別の実施形態では、本発明のヘテロ多量体（例えば、ヘテロ三量体またはヘテロ四量体など）は、本発明のポリペプチドが、溶液中で本発明のポリペプチドに対する抗体（本発明の融合タンパク質中の異種ポリペプチド配列に対する抗体を含む）と接触する場合に、形成される。他の実施形態では、本発明の多量体は、本発明のポリペプチドとの、および／または本発明のポリペプチド間での共有結合によって形成される。このような共有結合は、ポリペプチド配列（例えば、配列番号Yに列挙されるか、または配列番号Xおよび／もしくはcDNAプラスミドVによってコードされるポリペプチド中に含まれる、ポリペプチド配列）中に含まれる1以上のアミノ酸残基を含み得る。1例では、この共有結合は、ネイティブ（すなわち、天然に存在する）ポリペプチドにおいて相互作用するポリペプチド配列内に存在するシステイン残基間での架橋である。別の例では、この共有結合は、化学的操作または組換え操作の結果である。あるいは、このような共有結合は、融合タンパク質中の異種ポリペプチド配列において含まれる、1以上のアミノ酸残基を含み得る。1例では、共有結合は、本発明の融合タンパク質に含まれる異種配列間にある（例えば、米国特許番号第5,478,925号を参照のこと）。特定の例では、この共有結合は、（本明細書中に記載されるような）本発明のFc融合タンパク質に含まれる異種配列間にある。別の特定の例では、本発明の融合タンパク質の共有結合は、共有結合した多量体を形成し得る別のタンパク質（例えば、オステオプロテゲリン（osteop

r o t e g e r i n) (例えば、国際公開第WO 98/49305号(この内容はその全体が本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)など)由来の異種ポリペプチド配列間にある。別の実施形態では、2以上の本発明のポリペプチドは、ペプチドリンカーを介して連結される。例としては、米国特許番号第5,073,627号(本明細書中に参考として援用される)に記載されるペプチドリンカーが挙げられる。ペプチドリンカーによって隔てられた本発明の複数のポリペプチドを含むタンパク質は、従来の組換えDNA技術を用いて生成され得る。

【0170】

本発明の多量体ポリペプチドを調製する別の方法は、ロイシンジッパーまたはイソロイシンジッパーのポリペプチド配列に融合した本発明のポリペプチドの使用を含む。ロイシンジッパードメインおよびイソロイシンジッパードメインは、それらが発見されたタンパク質の多量体化を促進するポリペプチドである。ロイシンジッパーは、本来、いくつかのDNA結合タンパク質(Landschulzら、Science 240:1759(1988))において同定され、そしてそれ以来、種々の異なるタンパク質から見出されている。公知のロイシンジッパーは、共通して、二量体化または三量体化する天然に存在するペプチド、およびそれらの誘導体である。本発明の可溶性多量体タンパク質を産生するために適切なロイシンジッパードメインの例は、PCT出願WO94/10308(本明細書中で参考として援用される)に記載されるロイシンジッパードメインである。溶液中で二量体化または三量体化するポリペプチド配列と融合した、本発明のポリペプチドを含む組換え融合タンパク質は、適切な宿主細胞において発現され、そして得られる可溶性多量体融合タンパク質は、当該分野で公知の技術を使用して、培養上清から回収される。

【0171】

本発明の三量体ポリペプチドは、増大した生物学的活性の利点を提供し得る。好ましいロイシンジッパー部分およびイソロイシン部分は、優先的に三量体を形成するものである。1つの例は、Hoppeら(FEBS Letters 344:191,(1994))および米国特許出願第08/446,922号(

本明細書中で参考として援用される)に記載されるような、肺サーファクタントタンパク質D (SPD) から誘導されるロイシンジッパーである。天然に存在する三量体タンパク質から誘導される他のペプチドは、本発明の三量体ポリペプチドの調製において使用され得る。

【 0 1 7 2 】

別の例において、本発明のタンパク質は、F l a g (登録商標) ポリペプチド配列を含む本発明の融合タンパク質に含まれるF l a g (登録商標) ポリペプチド配列間の相互作用によって結合される。さらなる実施形態において、本発明の結合タンパク質は、本発明のF l a g (登録商標) 融合タンパク質に含まれる異種ポリペプチド配列と抗F l a g (登録商標) 抗体との間の相互作用によって結合される。

【 0 1 7 3 】

本発明の多量体は、当該分野で公知の化学技術を用いて生成され得る。例えば、本発明の多量体中に含まれることが所望されるポリペプチドは、当該分野で公知のリンカー分子およびリンカー分子長最適化技術を用いて化学的に架橋され得る(例えば、米国特許番号第5, 478, 925号を参照のこと、これは、本明細書中でその全体が参考として援用される)。さらに、本発明の多量体は、多量体中に含まれることが所望されるポリペプチドの配列中に位置するシステイン残基間に1つ以上の分子間架橋を形成するために、当該分野で公知の技術を用いて生成され得る(例えば、米国特許番号第5, 478, 925号を参照のこと、これは、本明細書中でその全体が参考として援用される)。さらに、本発明のポリペプチドは、そのポリペプチドのC末端またはN末端へのシステインまたはビオチンの付加によって慣用的に改変され得、そして当該分野で公知の技術が、1つ以上のこれらの改変したポリペプチドを含む多量体を生成するために適用され得る(例えば、米国特許番号第5, 478, 925号を参照のこと、これは、本明細書中でその全体が参考として援用される)。さらに、当該分野で公知の技術は、本発明の多量体に含まれることが所望されるポリペプチド成分を含むリボソームを生成するために適用され得る(例えば、米国特許番号第5, 478, 925号を参照のこと、これは、本明細書中でその全体が参考として援用される)。

【 0 1 7 4 】

あるいは、本発明の多量体は、当該分野で公知の遺伝子工学技術を用いて生成され得る。1つの実施形態において、本発明の多量体中に含まれるポリペプチドは、本明細書中に記載されるかまたはさもなくば当該分野で公知の融合タンパク質技術を用いて組換え産生される（例えば、米国特許番号第5,478,925号を参照のこと、これは、本明細書中でその全体が参考として援用される）。特定の実施形態において、本発明のホモ二量体をコードするポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、リンカーポリペプチドをコードする配列に連結し、次いで、もともとのC末端からN末端へ逆方向にポリペプチドの翻訳産物をコードする合成ポリヌクレオチド（リーダー配列を欠く）に、さらに連結することによって生成される（例えば、米国特許番号第5,478,925号を参照のこと、これは、本明細書中でその全体が参考として援用される）。別の実施形態において、本明細書中に記載されるかまたはさもなくば当該分野で公知の組換え技術が適用されて、膜貫通ドメイン（あるいは疎水性ペプチドまたはシグナルペプチド）を含む本発明の組換えポリペプチドを生成し、そしてこれは、膜再構成技術によってリボソームに取り込まれ得る（例えば、米国特許番号第5,478,925号を参照のこと、これは、本明細書中でその全体が参考として援用される）。

【 0 1 7 5 】

(抗体)

本発明のさらなるポリペプチドは、特異的抗体-抗原結合をアッセイするための当該分野で周知のイムノアッセイにより決定されるような、本発明の配列番号Yのポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、もしくは改変体、および/または本発明のエピトープに免疫特異的に結合する、抗体およびT-細胞抗原レセプター（TCR）に関する。本発明の抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体、単鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、Fab発現ライブラリーによって産生されたフラグメント、抗イディオタイプ（抗Id）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体が挙げられる）、および任意の上記抗体の

エпитープ結合フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」とは、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分（すなわち、抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子）をいう。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意の型（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスの分子であり得る。

【 0 1 7 6 】

最も好ましくは、抗体は、本発明のヒト抗原結合抗体フラグメントであり、そしてFab、Fab' およびF(ab')₂、Fd、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド連結Fv(sdFv) およびVLドメインまたはVHドメインのいずれかを含むフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。単鎖抗体を含む抗原結合抗体フラグメントは、可変領域を、単独であるいは以下：ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインの全体または部分との組み合わせで含み得る。ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインと可変領域の任意の組み合わせをもまた含む抗原結合フラグメントもまた、本発明に含まれる。本発明の抗体は、鳥類および哺乳動物を含む任意の動物起源由来であり得る。好ましくは、この抗体は、ヒト、ネズミ（例えば、マウスおよびラット）、ロバ、ウサギ（ship rabbit）、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリである。本明細書中で使用される場合、「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、そしてヒト免疫グロブリンライブラリーから、または1つ以上のヒト免疫グロブリンについてトランスジェニックでかつ内因性免疫グロブリンを発現しない動物（以下および、例えば、Kucherlapatiらによる米国特許番号第5,939,598号に記載されるような）から単離された抗体を含む。

【 0 1 7 7 】

本発明の抗体は、一重特異的、二重特異的、三重特異的またはより多価の多重特異的であり得る。多重特異的な抗体は、本発明のポリペプチドの異なるエпитープに対して特異的であり得るか、または本発明のポリペプチドおよび異種エピ

トープ（例えば、異種ポリペプチドまたは固体支持体物質）の両方に特異的であり得る。例えば、PCT公開WO 93/17715；WO92/08802；WO 91/00360；WO 92/05793；Tuttlら、J. Immunol. 147:60-69 (1991)；米国特許第4,474,893号；同第4,714,681号；同第4,925,648号；同第5,573,920号；同第5,601,819号；Kostelnyら、J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)を参照のこと。

【0178】

本発明の抗体は、この抗体により認識されるかまたは特異的に結合される本発明のポリペプチドのエピトープまたは部分によって、記載され得るかまたは特定化され得る。このエピトープまたはポリペプチド部分は、本明細書中に記載されるように、例えば、N末端およびC末端位置により、または連続するアミノ酸残基のサイズにより、特定化され得る。本発明の任意のエピトープまたはポリペプチドを特異的に結合する抗体はまた排除され得る。従って、本発明は、本発明のポリペプチドを特異的に結合し、そしてこのポリペプチドの排除を可能にする抗体を含む。

【0179】

本発明の抗体はまた、その交差反応性によって記載され得るか、または特定化され得る。本発明のポリペプチドの任意の他のアナログ、オルソログ (ortholog) またはホモログを結合しない抗体が、含まれる。本発明のポリペプチドに対して少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%および少なくとも50%の同一性（当該分野で公知の方法および本明細書において記載された方法を用いて計算される場合）を有するポリペプチドを結合する抗体もまた、本発明に含まれる。特定の実施形態において、本発明の抗体は、ヒトタンパク質のマウスホモログ、ラットホモログおよび／またはウサギホモログならびにそれらの対応するエピトープと交差反応する。本発明のポリペプチドに対して95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満および5

0%未満の同一性（当該分野で公知の方法および本明細書において記載された方法を用いて計算される場合）を有するポリペプチドに結合しない抗体もまた、本発明に含まれる。特定の実施形態において、上記の交差反応性は、任意の単一特異的な抗原性ポリペプチドもしくは免疫原性ポリペプチド、または2、3、4、5もしくはそれより多くの本明細書中に開示される特異的な抗原性ポリペプチドおよび／または免疫原性ポリペプチドの組み合わせに関する。さらに本発明には、（本明細書中に記載されるような）ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを結合する抗体が含まれる。本発明の抗体はまた、本発明のポリペプチドに対するその結合親和性によって記載または特定され得る。好ましい結合親和性としては、 5×10^{-2} M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-4} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、または 10^{-15} M未満の解離定数すなわちK_dを有する結合親和性が挙げられる。

【0180】

本発明はまた、競合的な結合を決定するための当該分野で公知の任意の方法（例えば、本明細書中に記載されるイムノアッセイ）によって決定されるような、本発明のエピトープに対する抗体の結合を競合的に阻害する抗体を提供する。好ましい実施形態において、この抗体は、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%、エピトープに対する結合を競合的に阻害する。

【0181】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストとして作用し得る。例えば、本発明は、レセプター／リガンドと本発明のポリペプ

チドとの相互作用を部分的または完全にのいずれかで破壊する抗体を含む。好ましくは、本発明の抗体は、本明細書中に開示される抗原性のエピトープまたはその部分に結合する。本発明は、レセプター特異的抗体およびリガンド特異的抗体の両方を特徴とする。本発明はまた、リガンド結合を妨げないがレセプターの活性化を妨げるレセプター特異的抗体を特徴とする。レセプターの活性化（すなわち、シグナル伝達）は、本明細書中に記載される技術、またはさもなくば当該分野で公知の技術によって決定され得る。例えば、レセプターの活性化は、（例えば、上記されたような）免疫沈降、続いてウエスタンブロット分析によって、レセプターのリン酸化（例えば、チロシンまたはセリン／スレオニン）あるいはその基質を検出することによって決定され得る。特定の実施形態において、抗体の非存在下の活性の少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%でリガンド活性またはレセプター活性を阻害する抗体を提供する。

【 0 1 8 2 】

本発明はまた、リガンド結合およびレセプター活性化の両方を妨げるレセプター特異的抗体、ならびにレセプターーリガンド複合体を認識し、そして、好ましくは、結合していないレセプターまたは結合していないリガンドを特異的に認識しない抗体を特徴とする。同様に、本発明には、リガンドに結合し、そしてリガンドのレセプターへの結合を妨げる中和抗体、ならびにリガンドに結合し、それによってレセプター活性化を妨げるが、リガンドがレセプターに結合することは妨げない抗体が含まれる。さらに本発明に含まれるのは、レセプターを活性化する抗体である。これらの抗体は、レセプターアゴニストとして作用し得、すなわち、リガンド媒介のレセプター活性化の生物学的活性のすべてまたはサブセット（*subset*）のいずれかを増強または活性化し得る（例えば、レセプターの二量体化を誘導することによる）。この抗体は、本明細書中に開示される本発明のペプチドの特定の生物学的活性を含む生物学的活性に対するアゴニスト、アンタゴニストまたはインバース（*inverse*）アゴニストとして特定化され得る。上記の抗体アゴニストは、当該分野で公知の方法を用いて作製され得る。例

例えば、PCT公開WO96/40281；米国特許第5,811,097号；Dengら、Blood 92(6)：1981-1988(1998)；Chenら、Cancer Res. 58(16)：3668-3678(1998)；Harropら、J. Immunol. 161(4)：1786-1794(1998)；Zhuら、Cancer Res. 58(15)：3209-3214(1998)；Yoonら、J. Immunol. 160(7)：3170-3179(1998)；Pratら、J. Cell. Sci. 111(Pt 2)：237-247(1998)；Pitardら、J. Immunol. Methods 205(2)：177-190(1997)；Liautardら、Cytokine 9(4)：233-241(1997)；Carlsonら、J. Biol. Chem. 272(17)：11295-11301(1997)；Tarymanら、Neuron 14(4)：755-762(1995)；Mullerら、Structure 6(9)：1153-1167(1998)；Bartunekら、Cytokine 8(1)：14-20(1996)（上記の文献はすべて、その全体が本明細書において参考として援用される）を参照のこと。

【0183】

本発明の抗体は、例えば、インビトロおよびインビボの両方における診断方法および治療方法を含む本発明のポリペプチドを精製、検出および標的化するために使用され得るが、これに限定されない。例えば、この抗体は、生物学的サンプルにおいて本発明のポリペプチドのレベルを定性的および定量的に測定するためのイムノアッセイにおいて用途を有する。例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1988)（その全体が参考として本明細書中に援用される）を参照のこと。

【0184】

以下により詳細が議論されるように、本発明の抗体は、単独で、または他の組成物との組み合わせのいずれかで用いられ得る。この抗体は、さらに、N末端もしくはC末端で異種ポリペプチドに組換え的に融合され得るか、またはポリペプ

チドもしくは他の組成物に化学的に結合（共有結合および非共有結合を含む）され得る。例えば、本発明の抗体は、検出アッセイにおける標識として有用な分子およびエフェクター分子（例えば、異種ポリペプチド、薬物、放射性核種または毒素）に、組換え的に融合または結合され得る。例えば、PCT公開WO92/08495；WO91/14438；WO89/12624；米国特許第5,314,995号；およびEP396,387号を参照のこと。

【0185】

本発明の抗体は、改変された（すなわち、共有結合性付着（covalent attachment）が、抗体が抗イディオタイプ応答を産生するのを妨げないような、抗体に対する任意の型の分子の共有結合性付着による）誘導体を含む。例えば、制限されないが、抗体誘導体としては、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化（pegylation）、リン酸化（phosphorylation）、アミド化、既知の保護基／ブロック基（blocking group）による誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への連結などによって改変された抗体が挙げられる。多数の任意の化学的改変が、特異的化学切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成などを含むが、これらに制限されない公知の技術によって実行され得る。さらに、誘導体は、1つ以上の非古典的アミノ酸を含み得る。

【0186】

本発明の抗体は、当該分野で公知の任意の適切な方法によって産生され得る。目的の抗原に対するポリクローナル抗体は、当該分野で周知の種々の手順によって産生され得る。例えば、本発明のポリペプチドが種々の宿主動物（ウサギ、マウス、ラットなどを含むがこれらに限定されない）に投与されて、抗原に対して特異的なポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導し得る。種々のアジュバントが、宿主種に依存して、免疫学的応答を増加させるために使用され得、そしてこれには、フロイント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル（mineral gel）、リゾレシチンのような界面活性物質、プルロニック（pluronic）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンベットヘモシアニン、ジニトロフェノール、なら

びにBCG（カルメットーゲラン杆菌）およびcorynebacterium parvumのような潜在的に有用なヒトアジュバントを含むが、これらに限定されない。このようなアジュバントはまた、当該分野で周知である。

【0187】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え、およびファージディスプレイ技術、またはそれらの組み合わせの使用を含む、当該分野で公知の広範な種々の技術を用いて調製され得る。例えば、モノクローナル抗体は、当該分野で公知の以下に挙げられるハイブリドーマ技術を使用して産生され得、例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版、1988) ; Hammerlingら、Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y. 1981)（上記の参考文献は、その全体が参考として援用される）に教示される。本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」とは、ハイブリドーマ技術を通して生成された抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」とは、任意の真核生物、原核生物、またはファージクローンを含む単一のクローンに由来する抗体をいい、そしてその生成される方法ではない。

【0188】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を産生およびスクリーニングする方法は、当該分野で慣用的かつ周知であり、そして実施例に詳細に議論される。非限定的な実施例において、マウスは、本発明のポリペプチドまたはそのようなペプチドを発現する細胞を用いて免疫され得る。一旦免疫応用が検出される（例えば、抗原に特異的な抗体がマウスの血清中に検出される）と、マウスの脾臓を収集しそして脾細胞を単離する。次に、その脾細胞を周知の技術によって任意の適切な骨髓腫細胞（例えば、ATCCから入手可能な細胞株SP20由来の細胞）に融合させる。ハイブリドーマを限界希釈によって選択およびクローン化する。次に、ハイブリドーマクローンを、本発明のポリペプチドに結合し得る抗体を分泌する細胞について、当該分野で公知の方法によってアッセイする。一般的に高い

レベルの抗体を含む腹水 (a s c i t e s f l u i d) が、陽性ハイブリドーマクローンをを用いてマウスを免疫させることによって、産生され得る。

【 0 1 8 9 】

従って、本発明は、モノクローナル抗体および本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養する工程を包含する方法によって産生される抗体を、産生する方法を提供し、ここで、好ましくは、このハイブリドーマは、骨髓腫細胞と本発明の抗原で免疫したマウスから単離された脾細胞とを融合させることによって、次いで本発明のポリペプチドと結合し得る抗体を分泌するハイブリドーマクローンについて、融合物から生じるハイブリドーマをスクリーニングすることによって産生される。

【 0 1 9 0 】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技術によって産生され得る。例えば、本発明の F a b および F (a b ') 2 フラグメントは、(F a b フラグメントを産生するための) パパインまたは (F (a b ') 2 フラグメントを産生するための) ペプシンのような酵素を使用して、免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断によって産生され得る。F (a b ') 2 フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖の C H 1 ドメインを含む。例えば、本発明の抗体はまた、当該分野で公知の種々のファージディスプレイ方法を用いて産生され得る。ファージディスプレイ法において、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面に提示される。特定の実施形態において、そのようなファージは、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー (例えば、ヒトまたはマウス) から発現される抗原結合ドメインを提示するために利用され得る。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて選択または同定され得る (例えば、標識した抗体あるいは固体表面またはビーズに結合または捕捉された抗原を使用する)。これらの方法において用いられるファージは、代表的には、ファージ遺伝子 I I I タンパク質またはファージ遺伝子 V I I I タンパク質のいずれかに組換え的に融合された F a b 、 F v またはジスルフィド安定化された F v の抗体ドメインを有するファージから発現された f d および M 1 3 結合ドメインを含む糸状ファ

ージ (filamentous phage) である。本発明の抗体を作製するために用いられ得るファージディスプレイ方法の例としては、以下に開示される方法が挙げられる：Brinkmanら、J. Immunol. Methods 182 : 41 - 50 (1995) ; Amesら、J. Immunol. Methods 184 : 177 - 186 (1995) ; Kettleboroughら、Eur. J. Immunol. 24 : 952 - 958 (1994) ; Persicら、Gene 187 9 - 18 (1997) ; Burtonら、Advances in Immunology 57 : 191 - 280 (1994) ; PCT出願番号PCT/GB91/01134 ; PCT公開WO 90/02809 ; WO 91/10737 ; WO 92/01047 ; WO 92/18619 ; WO 93/11236 ; WO 95/15982 ; WO 95/20401 ; ならびに米国特許第5, 698, 426号 ; 同第5, 223, 409号 ; 同第5, 403, 484号 ; 同第5, 580, 717号 ; 同第5, 427, 908号 ; 同第5, 750, 753号 ; 同第5, 821, 047号 ; 同第5, 571, 698号 ; 同第5, 427, 908号 ; 同第5, 516, 637号 ; 同第5, 780, 225号 ; 同第5, 658, 727号 ; 同第5, 733, 743号および同第5, 969, 108号 (これらの各々は、本明細書中でその全体が参考として援用される) 。

【 0 1 9 1 】

上記参考文献に記載されるように、ファージ選択後、ファージ由来の抗体をコードする領域は、ヒト抗体を含む抗体の全体または任意の他の所望の抗原結合フラグメントを生成するために単離されかつ用いられ得、そして例えば、以下に詳細が記載されるように、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含む任意の所望の宿主において発現され得る。例えば、Fab、Fab' およびF(ab')₂フラグメントを組換え的に産生するための技術はまた、当該分野で公知の方法を用いて使用され得、このような方法は、以下に開示される：PCT公開WO 92/22324 ; Mullinaxら、BioTechniques 12 (6) : 864 - 869 (1992) ; およびSawaiら、AJR I 34 : 26 - 34 (1995) ; およびBetterら、Science

240:1041-1043 (1998) (これらの参考文献は、その全体が参考として援用される)。

【0192】

単鎖のFvsおよび抗体を産生するために用いられ得る技術の例としては、米国特許第4,946,778号および同第5,258,498号;Hustonら、Methods in Enzymology 203:46-88 (1991);Shuら、PNAS 90:7995-7999 (1993);およびSkerraraら、Science 240:1038-1040 (1988)に記載される技術が挙げられる。ヒトにおける抗体のインビボにおける使用およびインビトロ検出アッセイを含むいくつかの用途のために、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体の使用が好ましくあり得る。キメラ抗体とは、抗体の異なる部分が、異なる動物種に由来する分子(例えば、マウスモノクローナル抗体由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体)である。キメラ抗体を産生するための方法は、当該分野において公知である。例えば、Morrisson, Science 229:1202 (1985);Oiら、BioTechniques 4:214 (1986);Gilliesら、(1989) J. Immunol. Methods 125:191-202;米国特許第5,807,715号;同第4,816,567号;および同第4,816,397号を参照のこと(これらはそれらの全体が、参考として本明細書中に援用される)。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1つ以上の相補性決定領域(CDR)およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する所望された抗原に結合する非ヒト種抗体由来の抗体分子である。しばしば、ヒトフレームワーク領域内のフレームワーク残基(framework residue)は、抗原結合を変化させるため(好ましくは改善させるために)CDRドナー抗体由来の対応残基と置換される。これらフレームワークの置換は、当該分野で周知の方法によって同定され、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリング、ならびに特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較による。(例えば、Queenら、米国特許第5,585,089号;Riechmannら、N

ature 332:323 (1988) を参照のこと (これらはそれらの全体が参考として本明細書中に援用される)。抗体は、以下を含む当該分野で公知の種々の技術を用いてヒト化され得る：例えば、CDR-グラフティング (接合) (欧州特許第239,400号; PCT公開WO 91/09967; 米国特許第5,225,539号; 同第5,530,101号および同第5,585,089号)、ベニヤリング (veneyering) またはリサーフェイシング (resurfacing) (欧州特許第592,106号; 同第519,596号; Padlan, Molecular Immunology 28 (4/5) : 489-498 (1991); Studnickaら, Protein Engineering 7 (6) : 805-814 (1994); Roguskaら, PNAS 91:969-973 (1994))、およびチェーンシャッフリング (chain shuffling) (米国特許第5,565,332号)。

【0193】

完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置に対して特に所望される。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いた上記のファージディスプレイ法を含む当該分野で公知の種々の方法により作製され得る。米国特許第4,444,887号、同第4,716,111号; およびPCT公開WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735、およびWO 91/10741; (これらの各々はその全体が参考として本明細書中に援用される) もまた参照のこと。

【0194】

ヒト抗体はまた、機能的内因性免疫グロブリンの発現は出来ないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し得るトランスジェニックマウスを用いて産生され得る。例えば、ヒト重鎖免疫グロブリン遺伝子およびヒト軽鎖免疫グロブリン遺伝子の複合体は、無作為にまたは相同組換えによってマウス胚性幹細胞に導入され得る。あるいは、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域 (diversity region) は、ヒト重鎖遺伝子およびヒト軽鎖遺伝子に加えて、マウスの

胚性幹細胞に導入され得る。マウス重鎖免疫グロブリン遺伝子およびマウス軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン座の導入と別々にまたは同時に非機能的にされ得る。特に、JH領域のホモ接合性の欠失は、内因性抗体の産生を妨げる。改変された胚性幹細胞を発展させ、そしてキメラマウスを産生するために胚盤胞中に微量注入する。次に、キメラマウスを、ヒト抗体を発現するホモ接合性の子孫を産生するために繁殖させる。トランスジェニックマウスを、選択された抗原（例えば、本発明のポリペプチドの全体または部分）を用いて通常の様式で免疫する。抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を用いて免疫したトランスジェニックマウスから得られ得る。トランスジェニックマウスに保持されたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再編成し、そしてその後、クラススイッチングおよび体細胞変異を受ける。従って、そのような技術の使用によって、治療的に有用なIgG抗体、IgA抗体、IgM抗体およびIgE抗体の産生が可能である。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概要については、L o n b e r g および H u s z a r、I n t. R e v. I m m u n o l. 13: 65-93 (1995) を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術のならびにそのような抗体を産生するためのプロトコールの詳細な議論については、例えば、P C T 公開 W O 98/24893; W O 92/01047; W O 96/34096; W O 96/33735; 欧州特許第0 598 877; 米国特許第5, 413, 923号; 同第5, 625, 126号; 同第5, 633, 425号; 同第5, 569, 825号; 同第5, 661, 016号; 同第5, 545, 806号; 同第5, 814, 318号; 同第5, 885, 793号; 同第5, 916, 771号; および同第5, 939, 598号を参照のこと（これらはその全体が本明細書中に参考として援用される）。さらに、A b g e n i x, I n c. (F r e e m o n t, C A) および G e n p h a r m (S a n J o s e, C A) のような企業は、上記の技術に類似した技術を用いて選択された抗原に対するヒト抗体を提供することに従事し得る。

【 0 1 9 5 】

選択されたエピトープを完全に認識するヒト抗体を、「ガイドされた (g u i

ded) 選択」といわれる技術を用いて産生し得る。このアプローチにおいて、選択された非ヒトモノクローナル抗体（例えば、マウス抗体）は、同じエピトープを完全に認識するヒト抗体の選択を導くために使用される。（Jespersら、Bio/technology 12:899-903 (1988)）。

【0196】

さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、当業者に周知の技術を用いて本発明のポリペプチドを「模倣する」抗イディオタイプ抗体を産生するために順々に利用され得る。（例えば、GreenspanおよびBona、FASEB J. 7 (5) : 437-444 ; (1989) およびNissinoff, J. Immunol. 147 (8) : 2429-2438 (1991) を参照のこと。）例えば、結合し、そしてポリペプチドの多量体化 (multimerization) および／またはリガンドに対する本発明のポリペプチドの結合を競合的に阻害する抗体が、ポリペプチドの多量体化ドメインおよび／または結合ドメインを「模倣する」抗イディオタイプを産生するために使用され得、そして結果としてポリペプチドおよび／またはそのリガンドに結合し、そして中和する。このような抗イディオタイプまたはそのような抗イディオタイプのFabフラグメントの中和は、ポリペプチドリガンドを中和するための治療的レジメンに使用され得る。例えば、そのような抗イディオタイプ抗体は、本発明のポリペプチドに結合するためおよび／またはそのリガンド／レセプターに結合するために使用され得、そしてそれによってその生物学的活性がブロックされる。

【0197】

（抗体をコードするポリヌクレオチド）

本発明はさらに、本発明の抗体およびそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、ストリンジェントな、またはより低いストリジェンシーなハイブリダイゼーション条件下で（例えば、上記に定義されるような）抗体（好ましくは、本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体、好ましくは、配列番号Yのアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合する抗体）をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

【 0 1 9 8 】

ポリヌクレオチドが、当該分野で公知の任意の方法によって得られ得、そしてそのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が決定される。例えば、抗体のヌクレオチド配列が知られている場合、この抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから構築され得（例えば、K u t m e i e r ら、B i o T e c h n i q u e s 17:242 (1994) に記載されるような）、これは、簡単にいうと、以下の工程を包含する：この抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラップするオリゴヌクレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、次いでP C Rによる連結されたオリゴヌクレオチドの増幅。

【 0 1 9 9 】

あるいは、抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源からの核酸から生成され得る。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンは入手不可能だが、その抗体分子の配列が既知である場合、その免疫グロブリンをコードする核酸は、化学的に合成され得るか、あるいは適切な供給源（例えば、抗体c D N Aライブラリー、または抗体を発現する任意の組織もしくは細胞（例えば、本発明の抗体の発現のために選択されたハイブリドーマ細胞）から生成されたc D N Aライブラリー、またはそれから単離された核酸（好ましくはポリA + R N A））から、例えば、その抗体をコードするc D N Aライブラリーからのc D N Aクローンを同定するために、配列の3'末端および5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するP C R増幅によって、または特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって得られ得る。P C Rによって生成された増幅された核酸は、次いで、当該分野で周知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローニングされ得る。

【 0 2 0 0 】

一旦、抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、抗体のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作について当該分野で周知の方法（例えば、組換えD N A技術、部位特異的変異誘発、P C Rなど（例えば、S a m b r o o k ら、1990, M o l e c u l a r C l o n i n g, A L

laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
および Ausubel ら編, 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY に記載の技術を参照のこと。これらは両方がその全体において本明細書に参考として援用される。)) を用いて操作され、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および / または挿入を作製するように異なるアミノ酸配列を有する抗体を生成し得る。

【 0 2 0 1 】

特定の実施形態において、重鎖および / または軽鎖の可変ドメインのアミノ酸配列は、相補性決定領域 (CDR) の配列の同定のために、当該分野において周知の方法によって (例えば、配列超可変性の領域を決定するために、他の重鎖、および軽鎖の可変領域を既知のアミノ酸配列と比較することによって) 調べられ得る。慣用的な組換え DNA 技術を用いて、1つ以上の CDR が、前述のようにフレームワーク領域内に (例えば、非ヒト抗体をヒト化するために、ヒトフレームワーク領域中に) 挿入され得る。このフレームワーク領域は天然に存在し得るか、またはコンセンサスフレームワーク領域であり得、そして好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る (例えば、列挙したヒトフレームワーク領域については、Chothia ら、J. Mol. Biol. 278 : 457 - 479 (1998) を参照のこと)。好ましくは、フレームワーク領域および CDR の組み合わせによって生成されたポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上記に議論されるように、1つ以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域内でなされ得、そして好ましくは、そのアミノ酸置換は、抗体のその抗原への結合を改善する。さらに、このような方法は、1つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠如した抗体分子を生成するように、鎖内ジスルフィド結合に関与する1つ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製するために使用され得る。ポリヌクレオチドへの他の変更は、本発明によって包含され、そして当該分野の技術の範囲内である。

【 0 2 0 2 】

さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングさせることによって、「キメラ抗体」を産生するために開発された技術（Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855 (1984) ; Neubergerら、Nature 312: 604-608 (1984) ; Takedaら、Nature 314: 452-454 (1985)）が使用され得る。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、例えば、マウスmAbおよびヒト免疫グロブリンの定常領域由来の可変領域を有するような分子（例えば、ヒト化抗体）である。

【0203】

あるいは、単鎖抗体の産生に関する記載された技術（米国特許第4,946,778号；Bird、Science 242: 423-42 (1988) ; Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988) ; およびWardら、Nature 334: 544-54 (1989)）が、単鎖抗体の産生に適応され得る。単鎖抗体は、Fv領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じる。E. coliにおける機能性Fvフラグメントのアセンブリのための技術もまた、使用され得る（Skerreraら、Science 242: 1038-1041 (1988)）。

【0204】

（抗体を産生する方法）

本発明の抗体は、抗体を合成するための当該分野で公知の任意の方法によって、特に、化学合成によって、または、好ましくは、組換え発現技術によって産生され得る。

【0205】

本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ（例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖または本発明の単鎖抗体）の組換え発現は、その抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。一旦、本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、あるいはそれらの

部分（好ましくは、重鎖または軽鎖の可変ドメインを含有する）をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生のためのベクターは、当該分野で周知の技術を用いる組換えDNA技術によって生成され得る。従って、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を調製するための方法は、本明細書に記載される。当業者に周知の方法は、抗体をコードする配列ならびに適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターの構築のために使用され得る。これらの方法には、例えば、インビトロの組換えDNA技術、合成技術、およびインビボの遺伝子組換えが挙げられる。従って、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体分子、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域（例えば、PCT公開 WO 86 / 0 5 8 0 7 ; PCT公開 WO 8 9 / 0 1 0 3 6 ; および米国特許第 5 , 1 2 2 , 4 6 4 号を参照のこと）をコードするヌクレオチド配列を含み得、そしてこの抗体の可変ドメインは、重鎖または軽鎖の全体の発現のためにこのようなベクターにクローニングされ得る。

【 0 2 0 6 】

この発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞へと移入され、そしてこのトランスフェクトされた細胞は、次いで、本発明の抗体を産生するために、従来技術によって培養される。従って、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または本発明の単鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二重鎖抗体の発現についての好ましい実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、以下に詳述されるように、免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞中に同時発現され得る。

【 0 2 0 7 】

種々の宿主発現ベクター系は、本発明の抗体分子を発現させるために利用され得る。このような宿主発現系は、目的のコード配列が産生され、かつ続いて精製され得るビヒクルを表わすが、また、適切なヌクレオチドをコードする配列で形

質転換またはトランスフェクトされる場合に、インサイチュで本発明の抗体分子を発現し得る細胞を表わす。これらには、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体をコードする配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換された細菌（例えば、*E. coli*、*B. subtilis*）のような微生物；抗体をコードする配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、*Saccharomyces*、*Pichia*）；抗体をコードする配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、*CaMV*；タバコモザイクウイルス、*TMV*）に感染した植物細胞系または抗体をコードする配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、*Ti*プラスミド）で形質転換された植物細胞系；あるいは哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物のウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含む組換え発現構築物を保有する哺乳動物細胞系（例えば、*COS*、*CHO*、*BHK*、293、3T3細胞）。好ましくは、*Escherichia coli*のような細菌細胞、そしてより好ましくは、特に、組換え抗体分子全体の発現のために真核生物細胞が、組換え抗体分子の発現のために使用される。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要前初期（major intermediate early）遺伝子プロモーターエレメントのようなベクターと組み合わされた、チャイニーズハムスターの卵巣細胞（*CHO*）のような哺乳動物細胞が、抗体のための効果的な発現系である（Foeckingら、*Gene* 45:101（1986）；Cockettら、*Bio/Technology* 8:2（1990））。

【0208】

細菌系において、多くの発現ベクターが、発現される抗体分子の意図する使用に依存して有利に選択され得る。例えば、多量のこのようなタンパク質が産生されるべき場合、抗体分子の薬学的組成物の生成のために、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を指向するベクターが所望され得る。このよう

なベクターには、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体をコードする配列が *lacZ* をコードする領域と共にベクターにインフレーム (in frame) で個別に連結され得、その結果、融合タンパク質が産生される *E. coli* 発現ベクター *pUR278* (Rutherford, EMBO J. 2:1791 (1983)) ; *pIN* ベクター (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985)) ; Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)) など。 *pGEX* ベクターもまた、グルタチオン *S*-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として、外来性ポリペプチドを発現させるために使用され得る。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、そして溶解した細胞から、マトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの吸着および結合、それに続く遊離グルタチオン存在下での溶出によって容易に精製され得る。この *pGEX* ベクターは、トロンビンまたは *Xa* 因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計され、その結果、このクローニングされた標的遺伝子産物は、GST 部分から放出され得る。

【 0 2 0 9 】

昆虫系においては、*Autographa californica* 核多角体病ウイルス (*AcNPV*) は、異種遺伝子を発現するためのベクターとして使用される。このウイルスは、*Spodoptera frugiperda* 細胞において増殖する。抗体をコードする配列は、このウイルスの非必須の領域 (例えばポリヘドリン遺伝子) に個々にクローニングされ得、そして *AcNPV* プロモーター (例えばポリヘドリンプロモーター) の制御下に配置され得る。

【 0 2 1 0 】

哺乳動物宿主細胞においては、多数のウイルスに基づく発現系が利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合においては、目的の抗体をコードする配列は、アデノウイルスの転写／翻訳制御複合体、例えば後期プロモーターおよび3つの部分に分かれるリーダー配列、に連結され得る。次いで、このキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビボでの組換えによって、アデノウイルスゲノムに挿入され得る。ウイルスのゲノムの非必須領域 (例えば、*E1* ま

たはE3領域)における挿入は、生存可能で、感染した宿主において抗体分子を発現する能力のある組換えウイルスを生じる(例えば、Logan & Shenk、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359(1984)を参照のこと)。特異的開始シグナルはまた、挿入された抗体をコードする配列の効率的な翻訳のために必要とされ得る。これらのシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接する配列を含む。さらに、この開始コドンは、挿入部分全体の翻訳を確実にするために、所望されるコード配列のリーディングフレーム(reading frame)と相が同じでなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、種々の起源、天然および合成の両方であり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーター、などの含有によって高められ得る(Bittnerら、Methods in Enzymol. 153:51-544(1987)を参照のこと)。

【0211】

さらに、挿入配列の発現を調節し、または所望される特異的な様式で遺伝子産物を改変およびプロセッシングする、宿主細胞株(strain)が選択され得る。タンパク質産物のこのような改変(例えばグリコシル化)およびプロセッシング(例えば切断)は、タンパク質の機能のために重要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の、翻訳後プロセッシングおよび改変のための、特徴的で特異的な機構を有する。適切な細胞株(line)または宿主系は、発現された異種タンパク質の正確な改変およびプロセッシングを確実にするように選択され得る。この目的のために、遺伝子産物の、第一の転写、グリコシル化、およびリン酸化の適切なプロセッシングのための細胞機構を有する、真核生物宿主細胞が、使用され得る。このような哺乳動物宿主細胞は、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、WI38、そして特に、例えば、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47Dのような乳癌細胞株(line)、ならびに、例えば、CRL7030およびHs578Bstのような正常な乳腺細胞株(line)、を含むがこれらに限定されない。

【0212】

組換えタンパク質の長期間の高収率産生、安定発現が好ましい。例えば、安定に抗体分子を発現する細胞株が操作され得る。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを使用するよりも、宿主細胞は、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位、など）、および選択マーカーによって制御されるDNAで形質転換され得る。異種DNAの導入に続いて、操作された細胞は、1～2日間富化培地で増殖させられ得、次いで、選択培地に切り替えられる。組換えプラスミドにおける選択マーカーは、選択したものに耐性を与え、そして細胞が、プラスミドをその染色体内に安定に組み込み、そして増殖して、細胞増殖巣を形成し、これを今度はクローニングし得、細胞株に拡張され得ることを可能にする。この方法は、抗体分子を発現する細胞株を操作するために、有利に使用され得る。このような操作された細胞株は、直接的または間接的に抗体分子と相互作用する化合物のスクリーニングおよび評価において、特に有用であり得る。

[0 2 1 3]

多数の選択系が使用され得、この選択系は、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Wiglerら、Cell 11:223（1977））、ヒボキサンチン-グアニン ホスホリボシルトランスフェラーゼ（Szybalska & Szybalski、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202（1992））、およびアデニン ホスホリボシルトランスフェラーゼ（Lowyら、Cell 22:817（1980））の遺伝子を含むが限定されず、これらの遺伝子は、tk-、hgprt-またはaprt-細胞においてそれぞれ使用され得る。また、代謝拮抗物質耐性は、以下の遺伝子の選択の根拠として使用され得る：dhfr、これはメトトレキサートに対する耐性を与える（Wiglerら、Natl. Acad. Sci. USA 77:357（1980））；O'Hareら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527（1981））；gpt、これはミコフェノール酸にに対する耐性を与える（Mulligan & Berg、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072（1981））；neo、これはアミノグリコシドG-418に対する耐性を与える（Clinical Pharmacy 12:4

88-505; WuおよびWu, *Biotherapy* 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260: 926-932 (1993); ならびにMorganおよびAnderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217 (1993); 1993年5月, *TIB TECH* 11(5): 155-215; ならびにhygro, これはハイグロマイシンにに対する耐性を与える (Santerreら, *Gene* 30: 147 (1984))。組換えDNA技術の分野で周知の方法は、所望の組換えクローンを選択するために、慣用的に適用され得、そしてこのような方法は、以下に記載されている: 例えば, Ausubelら (編), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Krieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); ならびに12章および13章, Dracopoliら (編), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapinら, *J. Mol. Biol.* 150: 1 (1981) (これらはその全体が本明細書中に参考として援用される)。

【0214】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増大され得る (総説として, BebbingtonおよびHentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, 第3巻 (Academic Press, New York, 1987) を参照のこと)。抗体を発現するベクター系におけるマーカーが、増幅可能であると、宿主細胞の培養物に存在するインヒビターのレベルにおける増加は、マーカー遺伝子のコピーの数を増加する。増副領域は抗体遺伝子と結合しているので、抗体の産生もま

た増加する (Crouseら、Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983))。

【0215】

宿主細胞は、本発明の二つの発現ベクター（重鎖由来のポリペプチドをコードする第一のベクターおよび軽鎖由来のポリペプチドをコードする第二のベクター）で、同時トランスフェクトされ得る。この二つのベクターは、重鎖および軽鎖のポリペプチドの等しい発現を可能にする、同一の選択マーカールを含み得る。あるいは、単一のベクターが使用され得、これは重鎖および軽鎖両方のポリペプチドをコードし、そして発現することができる。このような状況において、過剰の毒性の遊離重鎖を避けるために、重鎖の前に軽鎖が配置されるべきである (Proudfoot、Nature 322:52 (1986); Kohler、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980))。重鎖および軽鎖のためのコード配列はcDNAまたはゲノムDNAを含み得る。

【0216】

一旦本発明の抗体分子が、動物によって産生されるか、化学的に合成されるか、または組換えにより発現されると、当該分野で公知の、免疫グロブリン分子の精製のための任意の方法、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー（特に、プロテインAの後に特異的抗原に対するアフィニティーによる）、およびサイズカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質精製のための任意の他の標準的な技術によって、精製され得る。さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、本明細書中に記載されるかまたはそうでなければ当該分野において公知の、異種ポリペプチド配列に融合され得、精製を容易にする。

【0217】

本発明は、組換えにより融合され、または化学的に本発明のポリペプチド（もしくはその部分、好ましくはこのポリペプチドの少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100個のアミノ酸）に結合されて（共有結合および非共有結合の両方を含む）、融合タンパク質を生成する抗

体、を含む。この融合は、直接的である必要はないが、リンカー配列を介して起こり得る。この抗体は、本発明のポリペプチド（またはその部分、好ましくはこのポリペプチドの少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100個のアミノ酸）以外の抗原に特異的であり得る。例えば、インビトロまたはインビボのいずれにおいても、本発明のポリペプチドを特定の細胞表面のレセプターに特異的な抗体に本発明のポリペプチドに融合または結合させることによって、特定の細胞のタイプに対して、本発明のポリペプチドを標的にするために、抗体が使用され得る。本発明のポリペプチドに融合または結合される抗体はまた、インビトロ免疫アッセイおよび当該分野で公知の方法を使用する精製方法において使用され得る。例えば、Harborら、上記、およびPCT国際公開第WO93/21232号；EP439,095；Naramuraら、Immunol. Lett. 39:91-99（1994）；米国特許第5,474,981号；Gilliesら、PNAS89:1428-1432（1992）；Fellら、J. Immunol. 146:2446-2452（1991）を参照のこと。これらは、その全体が参考として援用される。

【0218】

本発明はさらに、抗体の可変領域以外のドメインに融合または結合された、本発明のポリペプチドを含む組成物を含む。例えば、本発明のポリペプチドは、抗体のFc領域、またはその部分に融合または結合され得る。この抗体の本発明のポリペプチドに融合された部分は、定常領域、ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン、またはそのドメイン全体もしくは部分の任意の組合せを含み得る。これらのポリペプチドはまた、上記の抗体の部分に融合または結合され、多重体を形成し得る。例えば、本発明のポリペプチドに融合されたFc部分は、このFc部分の間のジスルフィド結合を通して二量体を形成し得る。より高度の多量体形態は、ポリペプチドをIgAおよびIgMの部分に融合させることによって作製され得る。本発明のポリペプチドを抗体部分に融合または結合させるための方法は、当該分野において公知である。例えば、米国特許第5,336,603号；同第5,622,929号；同第5,359,046号；同第5,349,053号；同第5,447,851号；同第5,112

、 946号；EP 307, 434；EP 367, 166；PCT国際公開第WO96/04388号；第WO91/06570号；Ashkenaziら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991)；Zhengら、J. Immunol. 154:5590-5600 (1995)；およびVilら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341 (1992)（上記の参考文献はその全体が参考として援用される）を参照のこと。

【0219】

上で考察されたように、ポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、または配列番号Yの変異体、に対応するポリペプチドは、このポリペプチドのインビボ半減期を増大させるため、または当該分野で公知の方法を使用する免疫学的アッセイにおいて使用するために、上記の抗体部分に融合または結合され得る。さらに、配列番号Yに対応するポリペプチドを、上記の抗体部分に融合または結合して、精製を容易にし得る。1つの報告された例は、ヒトCD4ポリペプチドの最初の2つのドメイン、および哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質を記載している（EP 394, 827；Trauneckerら、Nature 331:84-86 (1988)）。ジスルフィド連結二量体構造（IgGに起因する）を有する抗体に融合または結合される、本発明のポリペプチドもまた、単量体分泌タンパク質またはタンパク質フラグメント単独よりも、他の分子に結合しそして中和するのにさらに効率的であり得る（Fountoulakisら、J. Biochem. 270:3958-3964 (1995)）。多くの場合、融合タンパク質のFc部分は、治療および診断において有益であり、従って、例えば、改良された薬物動態学的な特性を生じ得る（EP A 232, 262）。あるいは、融合タンパク質が発現され、検出され、そして精製された後に、Fc部分を欠失させることが望ましい。例えば、融合タンパク質が免疫化のための抗原として使用される場合、Fc部分は、治療および診断を妨害し得る。例えば、薬物の発見において、hIL-5のようなヒトタンパク質は、hIL-5のアンタゴニストを同定するための高スループットスクリーニングアッセイの目的のためにFc部分と融合さ

れてきた (Bennettら、J. Molecular Recognition 8:52-58 (1995); Johansonら、J. Biol. Chem. 270:9459-9471 (1995) を参照のこと)。

【0220】

さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、精製を容易にするペプチドのような、マーカー配列に融合され得る。好ましい実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、とりわけヘキサーヒスチジンペプチド（例えば、pQEベクター (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) において提供されるタグ）であり、これらの多くのマーカーアミノ酸配列が市販されている。例えば、Gentzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989) に記載されるように、ヘキサーヒスチジンは、融合タンパク質の都合の良い精製を提供する。精製のために有用な別のペプチドタグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する「HA」タグ (Wilsonら、Cell 137:767 (1984))、および「flag」タグを含むが、これに限定されない。

【0221】

本発明は、診断剤または治療剤に結合される、抗体またはそのフラグメントをさらに含む。抗体は、例えば、臨床上の試験手順（例えば、所与の処置レジメン (regimen) の効力を決定するため）の一部として、腫瘍の発生または進行をモニターするために、診断的に使用され得る。検出は、抗体を検出可能な物質と連結させることによって容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々の陽電子放射断層撮影を使用する陽電子放射金属、および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。この検出可能な物質は、当該分野で公知の技術を使用して、抗体（またはそのフラグメント）に対して直接的にかまたは媒介物（例えば、当該分野で公知のリンカー）を介して間接的にかのいずれかで、連結または結合され得る。例えば、本発明に従う診断薬としての使用のために抗体に結合され得る金属イオンに関しては、米国特許第4,741,900号を参照のこと。適切な

酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子団複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ；ならびに、適切な放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In または ^{99}Tc が挙げられる。

[0 2 2 2]

さらに、抗体またはそのフラグメントは、治療用部分（例えば細胞毒（例えば細胞増殖抑制性もしくは細胞殺傷性の薬剤））、治療剤または放射性金属イオン（例えば、 α -エミッター（例えば ^{213}Bi ））に結合され得る。細胞毒または細胞毒性薬剤は、細胞に対して有害な任意の薬剤を含む。例としては、パクリタキセル（*paclitaxol*）、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド（*tenoposide*）、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン（*dihydroxy anthracin dione*）、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびビューロマイシン、ならびにそのアナログまたはホモログ、が挙げられる。治療剤は、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、クロルメチン（*mechlorethamine*）、チオエパ（*thioepa*）クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（*BSNU*）およびロムスチン（*CCNU*）、シクロホスファミド（*cyclophosphamide*）、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびに

c i s - ジクロロジアミン白金 (I I) (D D P) シスプラチン)、アントラサイクリン (例えば、ダウノルビシン (以前はダウノマイシン) およびドキソルビシン)、抗生物質 (例えば、ダクチノマイシン (以前はアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン (a n t h r a m y c i n) (A M C))、ならびに抗有糸分裂剤 (例えばピンクリスチンおよびビンブラスチン) を含むが、それらに限定されない。

【 0 2 2 3 】

本発明の結合体は、所与の生物学的応答を改変するために使用され得、治療剤または薬物部分は、古典的な化学療法剤に限定されると解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質としては、例えば、毒素 (例えばアブリン、リシン A、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素) ; タンパク質 (例えば、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経発育因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン賦活剤、アポトーシス薬 (例えば、T N F - α 、T N F - β 、A I M I (国際公開第 W O 9 7 / 3 3 8 9 9 号を参照のこと)、A I M I I (国際公開第 W O 9 7 / 3 4 9 1 1 号を参照のこと)、F a s リガンド (T a k a h a s h i ら、I n t . I m m u n o l . 6 : 1 5 6 7 - 1 5 7 4 (1 9 9 4))、V E G F (国際公開第 W O 9 9 / 2 3 1 0 5 号を参照のこと))、血栓症薬もしくは抗脈管形成薬 (例えば、アンジオスタチンもしくはエンドスタチン) ; または生物学的応答改変剤 (例えばリンホカイン、インターロイキン-1 (「I L - 1」)、インターロイキン-2 (「I L - 2」)、インターロイキン-6 (「I L - 6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (「G M - C S F」)、顆粒球コロニー刺激因子 (「G - C S F」)、または他の増殖因子) が挙げられ得る。

【 0 2 2 4 】

抗体はまた、固体支持体に付着させられ得、この固体支持体は、標的抗原の免疫アッセイまたは精製に特に有用である。このような固体支持体としては、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが挙げられるがそれらに限定されない。

【0225】

このような治療部分を抗体に結合する技術は周知であり、例えば、Arnon
ら、「Monoclonal Antibodies For Immunot
argeting Of Drugs In Cancer Therapy」
Monoclonal Antibodies And Cancer The
rapy、Reisfeldら（編）、243-56頁（Alan R. Lis
s, Inc. 1985）；Hellstromら、「Antibodies F
or Drug Delivery」Controlled Drug Del
ivery（第2版）、Robinsonら（編）、623-53頁（Marc
el Dekker, Inc. 1987）；Thorpe、「Antibody
Carriers Of Cytotoxic Agents In Can
cer Therapy: A Review」Monoclonal Anti
bodies' 84: Biological And Clinical Ap
plications、Pincheraら（編）、475-506頁（198
5）；「Analysis, Results, And Future Pros
pective Of The Therapeutic Use Of Ra
diolabeled Antibody In Cancer Therap
y」Monoclonal Antibodies For Cancer D
etection And Therapy、Baldwinら（編）、303
-16頁（Academic Press 1985）、およびThorpeら
、「The Preparation And Cytotoxic Prop
erties Of Antibody-Toxin Conjugates」
、Immunol. Rev. 62: 119-58（1982）を参照のこと。

【0226】

あるいは、抗体は2次抗体に結合され、米国特許第4,676,980号（こ
れは、その全体が本明細書に参考として援用される）におけるSegalによる
記載のような抗体異種結合体（heteroconjugate）を形成し得る

【0227】

単独、あるいは細胞毒性因子および／またはサイトカインと組み合わせて投与される、抗体に結合する治療部分を有するかまたは有さない抗体が、治療薬として使用され得る。

【 0 2 2 8 】

(免疫表現型分類 (immunophenotyping))

本発明の抗体は、細胞株および生物学的サンプルの免疫表現型分類のために利用され得る。本発明の遺伝子の翻訳生成物は、細胞特異的マーカーとして、あるいはより詳細には、特定の細胞型の分化および／または成熟の種々の段階で差示的に発現される細胞マーカーとして有用であり得る。特異的エピトープ、またはエピトープの組み合わせに対して指向されるモノクローナル抗体は、マーカーを発現する細胞集団のスクリーニングを可能とする。種々の技術が、マーカーを発現する細胞集団をスクリーニングするために、モノクローナル抗体を用いて利用され得、そしてその技術には、抗体でコーティングされた磁気ビーズを用いる磁気分離、固体マトリクス（すなわち、プレート）に付着した抗体を用いる「パニング」、ならびにフローサイトメトリー（例えば、米国特許第5,985,660号；およびMorrisonら、Cell, 96:737-49 (1999)を参照のこと）が挙げられる。

【 0 2 2 9 】

これらの技術は、血液学的悪性腫瘍（すなわち、急性白血病患者における最少残留疾患 (minimal residual disease) (MRD)）および対宿主性移植片病 (GVHD) を予防するための移植術における「非自己」細胞と共に見出され得るような、細胞の特定集団のスクリーニングを可能にする。あるいは、これらの技術は、ヒト臍帯血において見出され得るような増殖および／または分化を受け得る、造血幹細胞および前駆細胞のスクリーニングを可能にする。

【 0 2 3 0 】

(抗体結合についてのアッセイ)

本発明の抗体は、当該分野において公知の任意の方法により、免疫特異的結合についてアッセイされ得る。用いられ得る免疫アッセイとしては、いくつかのもの

のについてだけ名称を挙げると、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインA免疫アッセイのような技術を用いる競合アッセイ系および非競合アッセイ系が挙げられるが、これらに限定されない。このようなアッセイは慣用的であり、そして当該分野において周知である（例えば、その全体が本明細書中に参考として援用される、Ausubelら編、1994、Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照のこと）。例示的な免疫アッセイが、以下に簡潔に記載される（が、これらは限定を目的とすることが意図されない）。

【0231】

免疫沈降プロトコルは、一般に、タンパク質ホスファターゼインヒビターおよび／またはプロテアーゼインヒビター（例えば、EDTA、PMSF、アプロチニン、パナジン酸ナトリウム）を補充したRIPA緩衝液（1% NP-40またはTriton X-100、1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、0.15M NaCl、0.01M リン酸ナトリウム（pH7.2）、1% Trasylol）のような溶解緩衝液中で、細胞の集団を溶解する工程、目的の抗体を細胞溶解物に添加する工程、一定時間（例えば、1～4時間）4℃でインキュベートする工程、プロテインAセファロースビーズおよび／またはプロテインGセファロースビーズを細胞溶解物に添加する工程、約1時間以上4℃でインキュベートする工程、溶解緩衝液中でビーズを洗浄する工程、およびSDS／サンプル緩衝液中でビーズを再懸濁する工程を包含する。目的の抗体の、特定の抗原を免疫沈降する能力は、例えば、ウエスタンブロット分析により、アッセイされ得る。当業者は、抗体の抗原への結合を増加するように、そしてバックグラウンドを減少させるように改変され得るパラメータ（例えば、セファロースビーズを用いて細胞溶解物を事前にきれいにする工程）に関して、認め得る。免疫沈降プロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ausub

e l ら編, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻, John Wiley & Sons, Inc., New York, 10. 16. 1を参照のこと。

【 0 2 3 2 】

ウエスタンブロット分析は、一般に、タンパク質サンプルを調製する工程、ポリアクリルアミドゲル（例えば、抗原の分子量に応じた8%～20% SDS-PAGE）中でのそのタンパク質サンプルの電気泳動、そのタンパク質サンプルをそのポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース、PVDFまたはナイロンのような膜に移す工程、ブロッキング溶液（例えば、3% BSAまたは脱脂粉乳を有するPBS）中でその膜をブロックする工程、洗浄緩衝液（例えば、PBS-Tween 20）中でその膜を洗浄する工程、ブロッキング緩衝液中で希釈された一次抗体（目的の抗体）を用いてその膜をブロックする工程、洗浄緩衝液中でその膜を洗浄する工程、ブロッキング緩衝液中で希釈された酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）あるいは放射性分子（例えば、 ^{32}P または ^{125}I ）に結合した二次抗体（一次抗体を認識する、例えば、抗ヒト抗体）を用いて、その膜をブロックする工程、洗浄緩衝液中でその膜を洗浄する工程、ならびにその抗原の存在を検出する工程を包含する。当業者は、検出されるシグナルを増加させるように、そしてバックグラウンドノイズを減少させるように改変され得るパラメータに関して、認め得る。ウエスタンブロットプロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ausubel ら編, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻, John Wiley & Sons, Inc., New York, 10. 8. 1を参照のこと。

【 0 2 3 3 】

ELISAは、抗原を調製する工程、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルをその抗原でコーティングする工程、酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）のような検出可能な化合物に結合体化された目的の抗体をそのウェルに添加し、そして一定時間インキュベートする工程、およびその抗原の存在を検出する工程を包含する。ELISAにおいて

、目的の抗体は、検出可能な化合物に結合している必要はない；その代わり、検出可能な化合物に結合体化された二次抗体（目的の抗体を認識する）が、ウェルに添加され得る。さらに、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、抗体がウェルにコーティングされ得る。この場合、検出可能な化合物に結合体化された二次抗体が、コーティングされたウェルへの目的の抗原の添加に続いて、添加され得る。当業者は、検出されるシグナルを増加させるように改変され得るパラメータ、および当該分野において公知のELISAの他のバリエーションに関して、認識し得る。ELISAに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら編、1994、Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、John Wiley & Sons, Inc., New York, 11.2.1を参照のこと。

【 0 2 3 4 】

抗原に対する抗体の結合親和性および抗体-抗原相互作用のオフレート（off-rate）が、競合結合アッセイにより決定され得る。競合結合アッセイの一つの例は、ラジオイムノアッセイであり、ラジオイムノアッセイは、漸増量の非標識抗原の存在下での、目的の抗体との標識された抗原（例えば、 ^3H または ^{125}I ）のインキュベーション、および標識抗原に結合体化された抗体の検出を含む。特定の抗原に対する目的の抗体の親和性、および結合オフレートは、スキャッチャードプロット分析によるデータから決定され得る。二次抗体との競合はまた、ラジオイムノアッセイを用いて決定され得る。この場合、抗原は、漸増量の非標識の二次抗体の存在下で、標識化合物（例えば、 ^3H または ^{125}I ）に結合した目的の抗体とともにインキュベートされる。

【 0 2 3 5 】

（治療用途）

本発明はさらに、抗体ベースの治療に関し、この治療は、1つ以上の開示された疾患、障害、または状態を処置するために、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトの患者に、本発明の抗体を投与する工程を包含する。本発明の治療化合物としては、本発明の抗体（本明細書中に記載されるような、それらのフラグメント、アナログおよび誘導体を含む）ならびに本発明の抗体をコー

ドする核酸（本明細書中に記載されるような、それらのフラグメント、アナログおよび誘導体ならびに抗イディオタイプ抗体を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体は、本発明のポリペプチドの異常な発現および／または活性に関連した疾患、障害または状態（本明細書中に記載される任意の1つ以上の疾患、障害、または状態を含むがこれらに限定されない）を処置、阻害または予防するために使用され得る。本発明のポリペプチドの異常な発現および／または活性に関連した疾患、障害または状態の処置および／または予防は、それらの疾患、障害または状態に関連した症状を緩和する工程を含むが、これに限定されない。本発明の抗体は、当該分野で公知であるか、または本明細書中に記載されるように、薬学的に受容可能な組成物中に提供され得る。

【 0 2 3 6 】

本発明の抗体が治療的に使用され得る方法の要約は、身体内で局所的にまたは全身的に、あるいは（例えば、補体（CDC）により、またはエフェクター細胞（ADCC）により媒介されるような）抗体の直接的細胞傷害性により、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを結合させることを含む。これらのアプローチのいくつかは、より詳細に以下に記載される。本明細書中で提供される教示を与えられれば、当業者は、過度の実験なしに、診断上の目的、モニタリングの目的あるいは治療上の目的のために、本発明の抗体を使用する方法がわかる。

【 0 2 3 7 】

本発明の抗体は、例えば、抗体と相互作用するエフェクター細胞の数または活性を増加させるために役立つ、他のモノクローナル抗体またはキメラ抗体、あるいはリンホカインまたは造血増殖因子（例えば、IL-2、IL-3およびIL-7のような）と組み合わせて有利に利用され得る。

【 0 2 3 8 】

本発明の抗体は、単独で、または他の型の処置（例えば、放射線療法、化学療法、ホルモン治療、免疫治療および抗腫瘍剤）との組み合わせで投与され得る。一般的に、（抗体の場合には）患者の種と同じ種である種起源または種反応性の生成物の投与が好ましい。従って、好ましい実施形態においては、ヒトの抗体、フラグメント誘導体、アナログ、または核酸が、治療または予防のために、ヒト

の患者に投与される。

【0239】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（それらのフラグメントを含む）に対するイムノアッセイ、およびそれらに関連した障害の治療の両方のために、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する、高親和性および／または強力な、インビボでの阻害抗体および／または中和抗体、それらのフラグメント、またはその領域を使用することが好ましい。このような抗体、フラグメント、または領域は、好ましくは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（それらのフラグメントを含む）に対して親和性を有する。好ましい結合親和性としては、 5×10^{-2} M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-4} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、および 10^{-15} Mよりも小さい解離定数すなわちK_dを有する結合親和性が挙げられる。

【0240】

（遺伝子治療）

特定の実施形態において、抗体またはその機能的誘導体をコードする配列を含む核酸は、本発明のポリペプチドの異常な発現および／または活性に関連した疾患または障害を処置、阻害または予防するために、遺伝子治療の目的で投与される。遺伝子治療とは、発現したか、または発現可能な核酸の、被験体への投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

【0241】

当該分野で利用可能な遺伝子治療のための任意の方法は、本発明に従って使用され得る。例示的な方法が以下に記載される。

【0242】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspiehlら、C11

nical Pharmacy 12:488-505 (1993); WuおよびWu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); ならびにMorganおよびAnderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May, TIB TECH 11(5):155-215 (1993)を参照のこと。使用される、組換えDNA技術分野において一般的に公知である方法は、Ausubelら(編), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); およびKriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)に記載される。

【0243】

好ましい局面において、化合物は抗体をコードする核酸配列を含有し、上記核酸配列は、適切な宿主において、抗体、あるいはそのフラグメントもしくはキメラタンパク質、またはその重鎖もしくは軽鎖を発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸配列は、抗体コード領域に作動可能に連結したプロモーターを有し、上記プロモーターは誘導性であるかまたは構成性であり、そして必要に応じて組織特異的である。別の特定の実施形態においては、抗体をコードする配列および任意の他の所望の配列がゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域に隣接した核酸分子が使用され、それにより抗体をコードする核酸の染色体内の発現を提供する(KollerおよびSmithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstraら, Nature 342:435-438 (1989))。特定の実施形態において、発現した抗体分子は単鎖抗体であるか; あるいはこの核酸配列は、この抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードする配列またはそのフラグメントを含む。

【0244】

核酸の患者への送達は、直接的（この場合、患者は核酸または核酸保有ベクターに直接的に曝される）か、または間接的（この場合、細胞は最初にインビトロで核酸で形質転換され、次いで患者に移植される）のいずれかであり得る。これらの2つのアプローチは、インビボ遺伝子治療として、またはエキソビボ遺伝子治療としてそれぞれ公知である。

【0.245】

特定の実施形態において、核酸配列はインビボで直接的に投与され、そこで核酸配列は発現されて、コードされた生成物を産生する。これは、当該分野で公知の多数の方法（例えば、それらを適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、そしてそれを細胞内になるように投与することにより（例えば、欠損性または弱毒化したレトロウイルスまたは他のウイルスベクター（米国特許第4,980,286号を参照のこと）を用いた感染により）、あるいは、裸のDNAの直接注射により、あるいは、微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃；BioListic, Dupont）の使用により、あるいは脂質または細胞表面レセプターでコーティングするか、あるいは薬剤をトランスフェクトすること、リボソーム、微粒子、またはマイクロカプセル中へのカプセル化により、あるいは、それらを核に入ることが公知であるペプチドと結合させて投与することにより、レセプター媒介のエンドサイトーシスを受けるリガンドと結合させて投与することにより（例えば、WuおよびWu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)を参照のこと）（レセプターを特異的に発現する細胞の型を標的にするために用いられ得る）などのいずれかにより達成され得る。別の実施形態において、核酸-リガンド複合体が形成され得、ここで、リガンドはエンドソームを破壊するフソジェニック（fusogenic）ウイルス性ペプチドを含み、核酸がリソソーム分解を回避することを可能にする。さらに別の実施形態において、核酸は、特異的なレセプターを標的化することにより、細胞特異的な取り込みおよび発現についてインビボで標的化され得る（例えば、PCT公開第WO92/06180号；同第WO92/22635号；同第WO92/20316号；同第WO93/14188号、同第WO93/20221号を参照のこと）。あるいは、核酸は、細胞内部に導入され得、そして相同組換えにより、

発現のために宿主細胞DNA中に組み込まれ得る (K o l l e r および S m i t h i e s , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 86 : 8932 - 8935 (1989) ; Z i j l s t r a ー , N a t u r e 342 : 435 - 438 (1989)) 。

【 0 2 4 6 】

特定の実施形態において、本発明の抗体をコードする核酸配列を含むウイルスベクターが使用される。例えば、レトロウイルスベクターが用いられ得る (M i l l e r ー , M e t h . E n z y m o l . 217 : 581 - 599 (1993) を参照のこと) 。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルス性ゲノムの正確なパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組込みのために必要な構成要素を含む。遺伝子治療において使用される抗体をコードする核酸配列は、一つ以上のベクター中にクローン化され、これは、患者内への遺伝子の送達を容易にする。レトロウイルスベクターに関するさらなる詳細は、B o e s e n ー , B i o t h e r a p y 6 : 291 - 302 (1994) (これは、幹細胞を化学療法に対してより耐性にするために、m d r 1 遺伝子を造血性幹細胞に送達するための、レトロウイルスベクターの使用を記載する) に見出され得る。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を説明する他の参考文献は、以下である : C l o w e s ー , J . C l i n . I n v e s t . 93 : 644 - 651 (1994) ; K i e m ー , B l o o d 83 : 1467 - 1473 (1994) ; S a l m o n s および G u n z b e r g , H u m a n G e n e T h e r a p y 4 : 129 - 141 (1993) ; ならびに G r o s s m a n および W i l s o n , C u r r . O p i n . i n G e n e t i c s a n d D e v e l . 3 : 110 - 114 (1993) 。

【 0 2 4 7 】

アデノウイルスは、遺伝子治療において使用され得る他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、特に、気道上皮へ遺伝子を送達するための魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは、自然に気道上皮に感染し、そこで軽い疾患を起こす。アデノウイルスに基づく送達システムの他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染すること

ができるという利点を有する。K o z a r s k y および W i l s o n , C u r r e n t O p i n i o n i n G e n e t i c s a n d D e v e l o p m e n t 3 : 4 9 9 - 5 0 3 (1 9 9 3) は、アデノウイルスに基づく遺伝子治療の概説を示す。B o u t r a , H u m a n G e n e T h e r a p y 5 : 3 - 1 0 (1 9 9 4) は、アカゲザルの気道上皮に遺伝子を移入するためのアデノウイルスベクターの使用を証明した。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の例は、R o s e n f e l d r a , S c i e n c e 2 5 2 : 4 3 1 - 4 3 4 (1 9 9 1) ; R o s e n f e l d r a , C e l l 6 8 : 1 4 3 - 1 5 5 (1 9 9 2) ; M a s t r a n g e l i r a , J . C l i n . I n v e s t . 9 1 : 2 2 5 - 2 3 4 (1 9 9 3) ; P C T 公 開 第 W O 9 4 / 1 2 6 4 9 号 ; および W a n g r a , G e n e T h e r a p y 2 : 7 7 5 - 7 8 3 (1 9 9 5) に見出され得る。好ましい実施形態において、アデノウイルスベクターが使用される。

【 0 2 4 8 】

アデノ随伴ウイルス (A A V) はまた、遺伝子治療における使用について提案されてきた (W a l s h r a , P r o c . S o c . E x p . B i o l . M e d . 2 0 4 : 2 8 9 - 3 0 0 (1 9 9 3) ; 米国特許第 5 , 4 3 6 , 1 4 6 号) 。

【 0 2 4 9 】

遺伝子治療に対する別のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、またはウイルス感染のような方法により、組織培養中の細胞へ遺伝子を移入する工程を含む。通常、移入の方法は、選択マーカーの細胞への移入を含む。次いで、細胞は、移入された遺伝子を取り込みそして発現している細胞を単離するために選別下に置かれる。それらの細胞は次いで、患者に送達される。

【 0 2 5 0 】

この実施形態においては、得られた組換え細胞のインビボ投与の前に、核酸が細胞に導入される。このような導入は、当該分野において公知の任意の方法により実施され得、それらの方法としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含むウイルスベクターまたはバクテリオファージベクターでの感染

、細胞融合、染色体媒介の遺伝子移入、マイクロセル (microcell) 媒介の遺伝子移入、スフェロプラスト融合など。外来遺伝子の細胞への導入については、当該分野において多数の技術が公知であり (例えば、Loeffler および Behr, Meth. Enzymol. 217: 599-618 (1993) ; Cohen ら, Meth. Enzymol. 217: 618-644 (1993) ; Cline, Pharmac. Ther. 29: 69-92m (1985) を参照のこと)、そしてレシピエント細胞の必要な発生的および生理学的機能が破壊されない場合、本発明に従って使用され得る。この技術は、核酸の細胞への安定した移入を提供するはずであり、その結果、核酸は、細胞により発現可能であり、そして好ましくは、その細胞の子孫により遺伝性でかつ発現可能である。

【 0 2 5 1 】

得られた組換え細胞は、当該分野において公知の様々な方法により、患者へ送達され得る。組換え血球 (例えば、造血幹細胞または造血前駆細胞) は、好ましくは、静脈内に投与される。使用が考えられる細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、そして当業者により決定され得る。

【 0 2 5 2 】

遺伝子治療の目的のために核酸が導入され得る細胞は、任意の所望の入手可能な細胞型を包含し、そして以下を含むがそれらに限定されない：上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞；Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球のような血球；種々の幹細胞または前駆細胞、特に、造血幹細胞または造血前駆細胞 (例えば、骨髓、臍帯血、末梢血、胎児の肝臓などから得られるような細胞)。

【 0 2 5 3 】

好ましい実施形態において、遺伝子治療に使用される細胞は、患者に対して自己である。

【 0 2 5 4 】

遺伝子治療において組換え細胞が使用される実施形態において、抗体をコードする核酸配列は、細胞またはそれらの子孫により核酸配列が発現可能であるよう

に細胞に導入され、次いで組換え細胞は、治療的効果のためにインビボで投与される。特定の実施形態において、幹細胞または前駆細胞が用いられる。インビトロで単離され、かつインビトロで維持され得る任意の幹細胞および／または前駆細胞は、本発明のこの実施形態に従って潜在的に使用され得る（例えば、PCT公開第WO94/08598号：StempleおよびAnderson, Cell 71:973-985 (1992)；Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A:229 (1980)；ならびにPittelkowおよびScott, Mayo Clinic Proc. 61:771 (1986)を参照のこと）。

【0255】

特定の実施形態において、遺伝子治療の目的で導入される核酸は、コード領域に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含有し、その結果、核酸の発現は、適切な転写誘導因子の存在または非存在を制御することにより制御可能である。

【0256】

本発明の化合物または薬学的組成物は、好ましくは、ヒトでの使用の前にインビトロで、次いでインビボで、所望の治療活性または予防活性について試験される。例えば、化合物または薬学的組成物の、治療有用性または予防有用性を証明するためのインビトロアッセイとしては、細胞株または患者組織サンプルに対する化合物の効果が挙げられる。細胞株および／または組織サンプルに対する化合物または組成物の効果は、当業者に公知である技術（ロゼット形成アッセイおよび細胞溶解アッセイが挙げられるがこれらに限定されない）を利用して決定され得る。本発明に従って、特定の化合物の投与が示されるかどうかを決定するために用いられ得るインビトロアッセイとしては、インビトロ細胞培養アッセイが挙げられ、このアッセイでは、患者組織サンプルが培養において増殖され、そして化合物に曝されるか、そうでなければ化合物が投与され、そして、組織サンプルに対するそのような化合物の効果が観察される。

【0257】

（治療的／予防的な投与および組成物）

本発明は、被験体への有効量の本発明の化合物または薬学的組成物、好ましくは本発明のポリペプチドまたは抗体の投与による処置、阻害および予防の方法を提供する。好ましい局面において、化合物は実質的に精製される（例えば、その効果を制限するかまたは望ましくない副作用を生じる物質を実質的に含まない）。被験体は好ましくは、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどのような動物が挙げられるがそれらに限定されない動物であり、そして好ましくは哺乳動物であり、そして最も好ましくはヒトである。

【 0 2 5 8 】

化合物が核酸または免疫グロブリンを含む場合に使用され得る処方および投与方法は、上記に記載され；さらなる適切な処方および投与経路は、本明細書中で以下に記載されたものの中から選択され得る。

【 0 2 5 9 】

種々の送達システムが公知であり、そして本発明の化合物を投与するために用いられ得る（例えば、リボソーム中でのカプセル化、微粒子、マイクロカプセル、この化合物の発現が可能な組換え細胞、レセプター媒介エンドサイトーシス（例えば、WuおよびWu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987) を参照のこと）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築など）。導入方法としては、皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口の経路が挙げられるがそれらに限定されない。化合物または組成物は、任意の好都合な経路により（例えば、注入またはボーラス注射により、上皮または粘膜内層（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など）を通しての吸収により）投与され得、そして他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与され得る。投与は、全身的または局所的であり得る。さらに、本発明の薬学的化合物または組成物を、任意の適切な経路（脳室内注射および髄腔内注射を包含し；脳室内注射は、例えば、Ommaya リザーバのようなりザーバに取り付けられた脳室内カテーテルにより容易にされ得る）により中枢神経系に導入することが望まれ得る。例えば、吸入器または噴霧器の使用、およびエアゾール化剤を用いた処方により、肺投与もまた使用され得る。

【 0 2 6 0 】

特定の実施形態において、本発明の薬学的化合物または組成物を、処置の必要な領域に局所的に投与することが望まれ得る；これは、制限する目的ではないが、例えば、手術中の局部注入、局所適用（例えば、手術後の創傷包帯との組み合わせ）により、注射により、カテーテルにより、坐剤により、またはインプラント（このインプラントは、シアラスティック（sialastic）膜のような膜または繊維を含む、多孔性、非多孔性、または膠様材料である）により達成され得る。好ましくは、抗体を含む本発明のタンパク質を投与する場合、タンパク質が吸収されない材料を使用するために注意が払われなければならない。

【0261】

別の実施形態において、化合物または組成物は、小胞、特に、リボソーム中へ送達され得る（Langer, Science 249:1527-1533 (1990) ; Treatら, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-BeresteinおよびFidler（編）, Liss, New York, 353~365頁（1989） ; Lopez-Berestein, 同書317~327頁を参照のこと ; 広く同書を参照のこと）。

【0262】

さらに別の実施形態において、化合物または組成物は制御された放出システム中で送達され得る。1つの実施形態において、ポンプが用いられ得る（Langer（前出） ; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987) ; Buchwaldら, Surgery 88:507 (1980) ; Saudекら, N. Engl. J. Med. 321:574 (1989) を参照のこと）。別の実施形態において、ポリマー材料が用いられ得る（Medical Applications of Controlled Release, LangerおよびWise（編）, CRC Press, Boca Raton, Florida (1974) ; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall（編）, Wiley, New York (1984) ; RangerおよびP

eppas, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983) を参照のこと; Levyら, *Science* 228:190 (1985); Duringら, *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howardら, *J. Neurosurg.* 71:105 (1989) もまた参照のこと)。さらに別の実施形態において、制御された放出システムは、治療標的、即ち、脳の近くに置かれ得、従って、全身用量の一部のみを必要とする（例えば、Goodson, *Medical Applications of Controlled Release* (前出), 第2巻, 115~138頁 (1984) を参照のこと)。

【0263】

他の制御された放出システムは、Langerにより総説において議論される (*Science* 249:1527-1533 (1990))。

【0264】

本発明の化合物がタンパク質をコードする核酸である、具体的な実施形態において、その核酸は、それを適切な核酸発現ベクターの一部として構成し、そしてそれが細胞内になるように投与することにより（例えば、レトロウイルスベクターの使用により（米国特許第4,980,286号を参照のこと）、または直接注射により、または微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont）の使用により、または脂質もしくは細胞表面レセプターもしくはトランスフェクト剤でコーティングすることにより、または核に入ることが公知であるホメオボックス様ペプチドと結合させて投与すること（例えば、Joliotら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868 (1991) を参照のこと）などにより、そのコードされたタンパク質の発現を促進するようにインピボで投与され得る。あるいは、核酸は、細胞内に導入され得、そして、発現のために相同組換えにより宿主細胞DNA内に組み込まれ得る。

【0265】

本発明はまた、薬学的組成物を提供する。このような組成物は、治療有効量の化合物、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。具体的な実施形態において

、用語「薬学的に受容可能な」とは、動物における、そしてさらに特にヒトにおける使用のために、連邦規制当局もしくは米国政府により認められたか、または米国薬局方もしくは他の一般に認められた薬局方に列挙されたことを意味する。用語「キャリア」とは、治療剤とともに投与される、希釈剤、アジュバンド、賦形剤、またはビヒクルをいう。このような薬学的なキャリアは、水および油（石油起源、動物起源、植物起源、または合成起源の油（例えば、ピーナッツ油、大豆油、鮎油、ゴマ油など）を含む）のような滅菌した液体であり得る。水は、薬学的組成物が静脈内に投与される場合に、好ましいキャリアである。生理食塩水溶液、ならびにデキストロースおよびグリセロールの水溶液はまた、特に注射可能な溶液のために、液体キャリアとして使用され得る。適切な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、イネ、フラワー、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、滑石、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物はまた、所望されるならば、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含み得る。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放性処方物などの形態を取り得る。この組成物は、従来の結合剤およびトリグリセリドのようなキャリアとともに、坐剤として処方され得る。経口処方物は、薬学的等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような標準キャリアを含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載される。このような組成物は、治療有効量の化合物を、好ましくは精製された形態で、適切な量のキャリアとともに含んで、患者への適切な投与のための形態を提供する。処方物は、投与形態に適するべきである。

【 0 2 6 6 】

好ましい実施形態において、組成物は、慣用手順に従って、ヒトへの静脈内投与のために採用された薬学的組成物として、処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液の溶液である。必要な場合、組成物は

また、可溶化剤および注射の部位での痛みを緩和するリグノカインのような局部麻酔を含み得る。一般的には、成分は、別々にかまたは単一投薬形態と一緒に混合してのどちらかで、例えば、一定量の活性薬剤を示すアンプルまたは小袋 (s a c h e t t e) のような密封された容器中の凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として供給される。組成物が注入により投与されるべき場合には、組成物は、滅菌した薬学的等級の水または生理食塩水を含む注入ボトルに分配され得る。組成物が注射により投与される場合、成分が投与の前に混合され得るように、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得る。

【 0 2 6 7 】

本発明の化合物は、中性のまたは塩の形態として処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するもののようなアニオンとともに形成される塩、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第2鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するもののようなカチオンとともに形成される塩が挙げられる。

【 0 2 6 8 】

この処置 (本発明のポリペプチドの異常な発現および / または活性と関連する疾患または障害の抑制および予防) において効果的である本発明の化合物の量は、標準的な臨床技術により決定され得る。さらに、インビトロアッセイは、必要に応じて、使用して最適な投薬量の範囲を同定するのを助け得る。処方において使用されるべき正確な用量はまた、投与の経路、および疾患または障害の重篤さに依存し、そして開業医の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験系から得られた用量反応曲線から外挿され得る。

【 0 2 6 9 】

抗体に関して、患者に投与される投薬量は、代表的に、患者の体重 1 k g あたり 0 . 1 m g ~ 1 0 0 m g である。好ましくは、患者に投与される投薬量は、患者の体重 1 k g あたり 0 . 1 m g と 2 0 m g との間であり、より好ましくは、患者の体重 1 k g あたり 1 m g ~ 1 0 m g である。一般に、ヒト抗体は、外来ポリ

ペプチドへの免疫応答に起因して、他種由来の抗体よりもヒト体内で長い半減期を有する。従って、ヒト抗体の低い投薬量および頻度の低い投与は、しばしば可能である。さらに、本発明の抗体の投与の投薬量および頻度は、改変（例えば、脂溶化（lipidation）のような）による抗体の取り込みおよび組織浸透（例えば、脳への）を増強することにより減少され得る。

【 0 2 7 0 】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の一つ以上の成分で満たされている一つ以上の容器を備える薬学的バックまたはキットを提供する。薬学的製品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制している政府機関により規定される形式における通告は、このような容器に、必要に応じて伴ない得る。この通告は、ヒトの投与のための製造、使用または販売のこの機関による認可を反映する。

【 0 2 7 1 】

（診断および画像化）

目的のポリペプチドに特異的に結合する標識化抗体、ならびにその誘導体およびそのアナログは、診断目的のために使用されて、本発明のポリペプチドの異常な発現および／または活性に関連する疾患、障害および／または状態を検出、診断またはモニターし得る。本発明は、目的のポリペプチドの異常な発現の検出について提供し、これは、（a）目的のポリペプチドに特異的な1つ以上の抗体を使用して、個体の細胞または体液中の目的のポリペプチドの発現をアッセイする工程、および（b）この遺伝子発現レベルと標準的な遺伝子発現のレベルを比較する工程、を包含し、これによって、その標準的な発現レベルと比較されるアッセイされたポリペプチド遺伝子発現レベルの増加または減少が、異常な発現を示す。

【 0 2 7 2 】

本発明は、障害を診断するための診断アッセイを提供し、このアッセイは、（a）目的のポリペプチドに特異的な1つ以上の抗体を使用して、個体の細胞または体液中の目的のポリペプチドの発現をアッセイする工程、および（b）この遺伝子発現レベルと標準的な遺伝子発現のレベルを比較する工程、を包含し、これによって、その標準的な発現レベルと比較されるアッセイされたポリペプチド遺

伝子発現レベルの増加または減少が、特定の障害を示す。癌に関して、個体由来の生検組織における比較的高い量の転写物の存在は、疾患の発生のための素因を示し得るか、または実際の臨床症状の出現前に疾患を検出するための手段を提供し得る。この型のより決定的な診断は、保健専門家に予防手段を使用させること、または早期の積極的な処置を可能にし得、これにより、癌の発生またはさらなる進行を予防する。

【 0 2 7 3 】

本発明の抗体を使用して、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を使用して生物学的サンプル中のタンパク質レベルをアッセイし得る（例えば、J a l k a n e n ら、J . C e l l . B i o l . 1 0 1 : 9 7 6 - 9 8 5 (1 9 8 5) ; J a l k a n e n ら、J . C e l l . B i o l . 1 0 5 : 3 0 8 7 - 3 0 9 6 (1 9 8 7) を参照のこと）。タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な、抗体に基づく他の方法としては、イムノアッセイ（例えば、酵素結合イムノソルベント検定法（E L I S A）および放射免疫測定法（R I A））が挙げられる。適切な抗体アッセイ標識は、当該分野において公知であり、そして酵素標識（例えば、グルコースオキシダーゼ）；放射性同位体（例えば、ヨウ素（ ^{125}I 、 ^{121}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{112}In ）、およびテクネチウム（ ^{99}Tc ））；発光標識（例えば、ルミノール）；ならびに蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）、ならびにビオチンが挙げられる。

【 0 2 7 4 】

本発明の1つの局面は、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトにおける、目的のポリペプチドの異常な発現と関連する疾患または障害の検出および診断である。1つの実施形態において、診断は、a) 目的のポリペプチドに特異的に結合する有効量の標識化分子を被験体に（例えば、非経口的に、皮下に、または腹腔内に）投与する工程；b) このポリペプチドが発現する被験体内の部位でこの標識化分子が優先的に濃縮することを可能にするために（および結合していない標識化分子がバックグラウンドレベルまで除去されるために）投与後、時間間隔を待つ工程；c) バックグラウンドレベルを決定する工程；および

d) この被験体中の標識化分子を検出する工程、を包含し、その結果、このバックグラウンドレベルを越える標識化分子の検出は、この被験体が目的のポリペプチドの異常な発現と関連する特定の疾患または障害を有することを示す。バックグラウンドレベルは、特定の系について以前に決定された標準的な値と、検出された標識化分子の量を比較する工程を包含する種々の方法により決定され得る。

【0275】

被験体の大きさおよび使用される画像化システムが、診断の画像を産生するために必要である画像化部分の量を決定するということは、当該分野において理解される。放射性同位体部分の場合、ヒト被験体について、注入される放射能の量は、通常、約5～20 mキュリーの範囲の99mTcである。次いで、標識化抗体または標識化抗体フラグメントは、特定のタンパク質を含む細胞の位置で優先的に蓄積する。インビボでの腫瘍の画像化は、S. W. Burchielら、「Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments」(Tumor Imaging、第13章:The Radiochemical Detection of Cancer, S. W. BurchielおよびB. A. Rhodes編、Masson Publishing Inc. (1982)において、記載される。

【0276】

使用する標識の型および投与の様式を含む、いくつかの変動に依存して、標識化分子が被験体中の部位に優先的に濃縮することを可能にするため、および結合していない標識化分子がバックグラウンドレベルまで除去されるための投与後の時間間隔は、6～48時間もしくは6～24時間または6～12時間である。別の実施形態において、投与後の時間間隔は、5～20日間または5～10日間である。

【0277】

1つの実施形態において、疾患および障害をモニターすることは、疾患または障害(disease)を診断するための方法を繰り返すことによって実施される(例えば、最初の診断から1ヶ月後、最初の診断から6ヶ月後、最初の診断か

ら1年後、など)。

【 0 2 7 8 】

標識化分子の存在は、インビボスキャニングについての当該分野で公知の方法を使用して患者中で検出され得る。これらの方法は、使用される標識の型に依存する。当業者は、特定の標識を決定するための適切な方法を決定することができる。本発明の診断方法において使用され得る方法およびデバイスは、コンピュータ連動断層撮影法 (C T) 、体全体のスキャン (例えば、陽子 (p o s i t i o n) 放射断層撮影法 (P E T)) 、磁気共鳴画像法 (M R I) 、および超音波診断法を含むが、これらに限定されない。

【 0 2 7 9 】

特定の実施形態において、分子を放射性同位体で標識し、そして放射応答外科的機器 (r a d i a t i o n r e s p o n s i v e s u r g i c a l i n s t r u m e n t) (T h u r s t o n ら、米国特許第 5 , 4 4 1 , 0 5 0 号) を使用して患者中で検出する。別の実施形態において、分子を蛍光化合物で標識し、そして蛍光応答スキャニング機器を使用して患者中で検出する。別の実施形態において、分子を陽電子射出金属で標識し、そして陽電子射出断層撮影法を使用して患者中で検出する。さらに別の実施形態において、分子を常磁性標識で標識し、そして磁気共鳴画像法 (M R I) を使用して患者中で検出する。

【 0 2 8 0 】

(キット)

本発明は、上記の方法において使用され得るキットを提供する。1つの実施形態において、キットは、1つ以上の容器において、本発明の抗体、好ましくは精製した抗体を備える。特定の実施形態において、本発明のキットは、エピトープを含む実質的に単離されたポリペプチドを備える。このエピトープは、キット中に含まれる抗体と特異的に免疫反応する。好ましくは、本発明のキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体をさらに備える。別の特の実施形態において、本発明のキットは、目的のポリペプチドへの抗体の結合を検出するための手段を備える (例えば、この抗体は、検出可能な基質 (例えば、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物もしくは発光化合物) に結合体化され得るか、ま

たは一次抗体を認識する二次抗体が、検出可能な基質と結合体化され得る)。

【0281】

本発明の別の特定の実施形態において、キットは、増殖性および／または癌性のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに対して特異的な抗体を含む血清のスクリーニングに使用するための診断キットである。このようなキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体を備え得る。このようなキットは、エピトープを含む実質的に単離されたポリペプチド抗原を備え得る。このエピトープは、少なくとも1つの抗ポリペプチド抗原抗体と特異的に免疫反応する。さらに、このようなキットは、抗原に対する上記の抗体の結合を検出するための手段を備える(例えば、抗体は、蛍光化合物(例えば、フローサイトメトリーにより検出され得るフルオレセインまたはローダミン)と結合体化され得る)。特定の実施形態において、キットは、組換え的に産生されたポリペプチド抗原または化学的に合成されたポリペプチド抗原を備え得る。キットのポリペプチド抗原はまた、固体支持体に付着され得る。

【0282】

より特定の実施形態において、上記のキットの検出手段は、上記のポリペプチド抗原が付着する固体支持体を備える。このようなキットはまた、非付着レポーター標識化抗ヒト抗体を備え得る。この実施形態において、ポリペプチド抗原への抗体の結合は、上記のレポーター標識化抗体の結合によって検出され得る。

【0283】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチドの抗原を含む血清のスクリーニングにおいて使用するための、診断キットを含む。この診断キットは、ポリペプチド抗原またはポリヌクレオチド抗原と特異的に免疫反応する実質的に単離された抗体、およびこの抗体へのこのポリヌクレオチド抗原またはポリペプチド抗原の結合を検出するための手段を備える。1つの実施形態において、抗体は、固体支持体に付着される。特定の実施形態において、抗体は、モノクロナール抗体であり得る。キットのこの検出手段は、二次標識化モノクロナール抗体を含み得る。あるいは、またはさらに、この検出手段は、標識化競合抗原を含み得る。

【 0 2 8 4 】

1つの診断構成において、試験血清を、本発明の方法により得られる表面結合抗原を有する固相試薬と反応させる。特定の抗原抗体とこの試薬との結合、および洗浄することによる結合していない血清成分の除去の後、この試薬をレポーター標識化抗ヒト抗体と反応させて、固体支持体上に、結合した抗抗原抗体の量に比例して、この試薬にレポーターを結合させる。この試薬を再び洗浄して、結合していない標識化抗体を除去し、そしてこの試薬と会合するレポーターの量を決定する。代表的に、レポーターは、酵素であり、この酵素は、適切な蛍光性基質、発光性基質または比色用基質（Sigma, St. Louis, MO）の存在下で固相をインキュベートすることにより検出される。

【 0 2 8 5 】

上記のアッセイにおける固体表面試薬は、タンパク質材料を固体支持体材料（例えば、高分子ビーズ、計深棒、96ウェルプレートまたは濾過材料）に付着させるための公知の技術により調製される。これらの付着方法としては、一般的に、支持体へのタンパク質の非特異的な吸着または固体支持体上の化学的に活性な基（例えば、活性化カルボキシル基、ヒドロキシル基、またはアルデヒド基）とのタンパク質の共有結合（covalent attachment）（代表的には、遊離アミン基を介する）が挙げられる。あるいは、ストレプトアビジンでコートされたプレートが、ビオチン化された抗原と共に使用され得る。

【 0 2 8 6 】

従って、本発明は、この診断方法を行うためのアッセイ系またはキットを提供する。このキットは、一般的に、表面結合された組換え抗原を有する支持体、および表面結合された抗抗原抗体を検出するための、レポーター標識された抗ヒト抗体を備える。

【 0 2 8 7 】

（ポリヌクレオチドの使用）

本明細書中で同定された各々のポリヌクレオチドは、試薬として多数の方法において使用され得る。以下の説明は例示的であるとみなされるべきであり、そして公知の技術を利用する。

【 0 2 8 8 】

本発明のポリヌクレオチドは、染色体同定のために有用である。実際の配列データ（反復多型性）に基づく染色体マーキング試薬は現在ほとんど利用可能ではないため、新しい染色体マーカーを同定する必要性が存在するままである。各々の配列は、個々のヒト染色体上の特定の位置に特に標的化され、そしてこの位置にハイブリダイズされ得る。従って、本発明の各々のポリヌクレオチドは、当該分野で公知の技術を用いて染色体マーカーとして慣用的に使用され得る。

【 0 2 8 9 】

簡単に言うと、配列は、配列番号 X で示される配列またはそれに対する相補体から P C R プライマー（好ましくは、少なくとも 1 5 b p（例えば、1 5 ～ 2 5 b p））を調製することによって染色体にマッピングされ得る。プライマーが、ゲノム D N A 中の 1 つより多くの予測されたエキソンにまたがらないように、プライマーは、コンピュータ分析を使用して必要に応じて選択され得る。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドの P C R スクリーニングのために使用される。配列番号 X に対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみが、増幅されたフラグメントを産生する。

【 0 2 9 0 】

同様に、体細胞ハイブリッドは、特定の染色体に対してポリヌクレオチドを P C R マッピングする迅速な方法を提供する。単一のサーマルサイクラーを使用して 1 日あたり 3 つ以上のクローンが割り当てられ得る。さらに、ポリヌクレオチドの下位位置決定 (s u b l o c a l i z a t i o n) は、特定の染色体フラグメントのパネルを用いて達成され得る。使用され得る他の遺伝子マッピング戦略は、インサイチュハイブリダイゼーション、標識フローソート (l a b e l e d f l o w s o r t e d) 染色体でのプレスクリーニング、染色体特異的 c D N A ライブラリーを構築するためのハイブリダイゼーションによる前選択、およびコンピュータマッピング技術（例えば、その全体が本明細書中に参考として援用される、Shuler, Trends Biotechnol 16: 456-459 (1998) など）を含む。

【 0 2 9 1 】

ポリヌクレオチドの正確な染色体位置はまた、中期染色体スプレッド (s p r e a d) の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (F I S H) を使用して獲得され得る。この技術は500または600塩基ほどの長さのポリヌクレオチドを使用する；しかし2,000~4,000bpのポリヌクレオチドが好ましい。この技術の総説に関しては、V e r m a ら、「H u m a n C h r o m o s o m e s : a M a n u a l o f B a s i c T e c h n i q u e s」, P e r g a m o n P r e s s , N e w Y o r k (1988)を参照のこと。

【0292】

染色体マッピングについては、ポリヌクレオチドは、個々に（単一染色体またはその染色体上の単一部位をマークするために）またはパネルで（複数部位および／または複数染色体をマークするために）使用され得る。

【0293】

従って、本発明はまた、染色体の位置決定のための方法も提供し、この方法は、（a）表1におけるポリヌクレオチド配列および配列番号XからPCRプライマーを調製する工程、ならびに（b）個々の染色体を含む体細胞ハイブリッドをスクリーニングする工程を包含する。

【0294】

本発明のポリヌクレオチドは、同様に、放射線ハイブリッドマッピング、H A P P Y マッピング、および長範囲制限マッピングに有用である。これらの技術および当該分野で公知の他の技術の概説について、例えば、D e a r 「G e n o m e M a p p i n g : A P r a c t i c a l A p p r o a c h」 I R L P r e s s a t O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s , L o n d o n (1997) ; A y d i n , J . M o l . M e d . 77 : 691 ~ 694 (1999) ; H a c i a ら , M o l . P s y c h i a t r y 3 : 483 ~ 492 (1998) ; H e r r i c k ら , C h r o m o s o m e R e s . 7 : 409 ~ 423 (1999) ; H a m i l t o n ら , M e t h o d s C e l l . B i o l . 62 : 265 ~ 280 (2000) ; および／または O t t , J . H e r e d . 90 : 68 ~ 70 (1999) （これらの各々は、その全体が参考として本明細書中に援用される）を参照のこと。

【 0 2 9 5 】

一旦、ポリヌクレオチドが正確な染色体位置にマップされると、ポリヌクレオチドの物理的位置は、連鎖分析において使用され得る。連鎖分析は、染色体位置と特定の疾患の提示との間の同時遺伝 (coinheritance) を確立する。(疾患マッピングデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryを通してオンラインで利用可能である) において見い出される)。1メガベースマッピング解像度および20kbあたり1遺伝子と仮定すると、疾患と関連する染色体領域に正確に位置決定されるcDNAは、50~500の潜在的な原因遺伝子のうちの1つであり得る。

【 0 2 9 6 】

従って、一旦、同時遺伝が確立されると、罹患個体と非罹患個体との間での本発明のポリヌクレオチドおよび対応する遺伝子における差異が試験され得る。まず、染色体中の可視的構造変化(例えば、欠失または転座)は染色体スプレッドにおいて、またはPCRによって試験される。構造的変化が存在しない場合、点変異の存在が確認される。何人かのまたは全ての罹患個体で観察されたが、正常な個体では観察されなかった変異は、この変異がこの疾患を引き起こし得ることを示す。しかし、いくつかの正常な個体由来のポリペプチドおよび対応する遺伝子の完全な配列決定は、変異を多型性と区別するために要求される。新しい多型性が同定される場合、この多型ポリペプチドはさらなる連鎖分析のために使用され得る。

【 0 2 9 7 】

さらに、非罹患個体と比較した、罹患個体の遺伝子の増加または減少した発現が、本発明のポリヌクレオチドを使用して評価され得る。任意のこれらの変化(変化した発現、染色体再配置、または変異)は、診断マーカーまたは予後マーカーとして使用され得る。

【 0 2 9 8 】

従って、本発明はまた、障害の診断の間に有用な診断方法を提供し、この方法

は、個体由来の細胞または体液中の本発明のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、および測定された遺伝子発現レベルを標準のポリヌクレオチド発現レベルと比較する工程を包含し、これによって、標準と比較して、遺伝子発現レベルの増加または減少が、障害の指標になる。

【 0 2 9 9 】

なお別の実施形態では、本発明は、サンプルを、試験被験体に由来する増殖性および／またはガン性のポリヌクレオチドの存在について分析するためのキットを含む。一般的実施形態において、このキットは、本発明のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドプローブ、および適切な容器を備える。この特定の実施形態では、このキットは、本発明のポリヌクレオチドの内部領域を規定する2つのポリヌクレオチドプローブを含み、ここで各プローブは、この領域に対して内部に3'末端を含む1つの鎖を有する。さらなる実施形態では、このプローブは、ポリメラーゼ連鎖反応増幅のためのプライマーとして有用であり得る。

【 0 3 0 0 】

例えば、腫瘍の診断を含む、関連障害の診断が既に従来方法によって行われている場合、本発明は、予後インジケータとして有用であり、それによって増強または抑制された本発明のポリヌクレオチドの発現を示す患者が、標準レベルにより近いレベルでこの遺伝子を発現する患者と比較して悪い臨床結果を経験する。

【 0 3 0 1 】

「本発明のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する（こと）」によって、本発明のポリペプチドのレベルまたは本発明のポリペプチドをコードするmRNAのレベルを、第1の生物学的サンプルにおいて直接的（例えば、絶対のタンパク質レベルまたはmRNAレベルを決定または評価することによって）または相対的（例えば、第2の生物学的サンプル中のポリペプチドレベルまたはmRNAレベルに対して比較することによって）のいずれかで定性的または定量的に測定または評価することが意図される。好ましくは、第1の生物学的サンプル中のポリペプチドレベルまたはmRNAレベルが測定または評価され、そして標準のポリ

ペプチドレベルまたはmRNAレベルに対して比較され、この標準は、関連障害を有さない個体から得られる第2の生物学的サンプルから得られるかまたは関連障害を有さない個体の集団由来のレベルを平均することによって決定される。当該分野で認識されるように、一旦標準的なポリペプチドレベルまたはmRNAレベルが公知になれば、これを、比較のための標準として反復して用い得る。

【 0 3 0 2 】

「生物学的サンプル」によって、本発明のポリペプチドまたは対応するmRNAを含む、個体、体液、細胞株、組織培養物または他の供給源から得られる任意の生物学的サンプルが意図される。示されるように、生物学的サンプルは、本発明のポリペプチドを含む体液（例えば、精液、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、本発明のポリペプチドを発現することが見出された組織供給源を含む。哺乳動物から組織生検および体液を得るための方法は、当該分野で周知である。生物学的サンプルがmRNAを含む場合、組織生検が好ましい供給源である。

【 0 3 0 3 】

上記で提供された方法は好ましくは、本発明のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドが固体支持体に結合される、診断方法および／またはキットに適用され得る。1つの例示的な方法では、この支持体は、米国特許第5,837,832号、同第5,874,219号および同第5,856,174号に記載される、「遺伝子チップ」または「生物学的チップ」であり得る。さらに、本発明のポリヌクレオチドが結合されたこのような遺伝子チップを用いて、本発明のポリヌクレオチド配列と、試験被験体から単離されたポリヌクレオチドとの間の多型性を同定し得る。このような多型の知識（すなわち、その多型の位置、およびその多型の存在）は、多くの障害（例えば、神経障害、免疫系障害、筋肉障害、生殖障害、胃腸障害、肺障害、心血管障害、腎障害、増殖性障害、ならびに／または癌性疾患および癌性状態）について、疾患遺伝子座を同定する際に有益である。このような方法は、米国特許第5,858,659号および同第5,856,104号に記載される。上記に参照した米国特許は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【 0 3 0 4 】

本発明は、化学的に合成された（すなわち、ペプチド核酸（PNA）として再現された）または当該分野で公知の他の方法に従って合成された、本発明のポリヌクレオチドを包含する。PNAの使用は、本発明のポリヌクレオチドが固体支持体、すなわち、遺伝子チップに取り込まれる場合、好ましい形態として役立つ。本発明の目的のために、ペプチド核酸（PNA）は、ポリアミド型のDNAアナログであり、そしてアデニン、グアニン、チミンおよびシトシンについてのモノマー単位が市販されている（Perceptice Biosystems）。DNAの特定の成分（例えば、リン、酸化リンまたはデオキシリボース誘導体）は、PNA中に存在しない。P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. BergおよびO. Buchardt, Science 254, 1497 (1997) ; ならびにM. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driever, R. H. Berg, S. K. Kim, B. NordenおよびP. E. Nielsen, Nature 365, 666 (1993) によって開示されるように、PNAは、相補的なDNA鎖に対して特異的かつ緊密に結合し、そしてヌクレアーゼによって分解されない。実際、PNAは、DNA自体が結合するよりも強力にDNAに結合する。これはおそらく、2つの鎖の間に静電斥力が存在せず、そしてまたポリアミド骨格がより可撓性が高いことによる。これによって、PNA/DNA二重鎖は、DNA/DNA二重鎖よりも広範囲のストリンジェンシー条件下で結合し、多重鎖ハイブリダイゼーションを行うのをより容易にする。強力な結合に起因して、DNAを用いてよりも小さいプローブが用いられ得る。さらに、おそらく、単一の塩基ミスマッチが、PNA/DNAハイブリダイゼーションを用いて決定され得る。なぜなら、PNA/DNAの15マーにおける単一のミスマッチは、DNA/DNAの15マー二重鎖については4℃～16℃であるのに対して、融点（ $T_{sub.m}$ ）を8～20℃低下させるからである。また、PNA中に電荷基が存在しないことは、ハイブリダイゼーションが、低いイオン強度で行われ得、そして分析の間の塩によって可能な妨害を減少させることを意味する。

【 0 3 0 5 】

本発明は、哺乳動物におけるガンの検出を含むがこれらに限定されない用途を有する。特に、本発明は、以下を含むがこれらに限定されない、病理学的細胞増殖新形成の診断の間に有用である：急性骨髄性白血病（急性単球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性赤白血病、急性巨核球性白血病、および急性未分化白血病などを含む）；および慢性骨髄性白血病（慢性骨髄単球性白血病、慢性顆粒球性白血病などを含む）。好ましい哺乳動物としては、有尾猿（monkey）、無尾猿（ape）、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギおよびヒトが挙げられる。特に好ましいのは、ヒトである。

【 0 3 0 6 】

病理学的細胞増殖障害はしばしば、原癌遺伝子の不適切な活性化に関連する（Gelmann, E. P. ら, 「The Etiology of Acute Leukemia: Molecular Genetics and Viral Oncology」, Neoplastic Diseases of the Blood, 第1巻, Wiernik, P. H. ら編, 161-182 (1985)）。新形成は現在、ウイルス配列の染色体への挿入、より活性に転写される領域への遺伝子の染色体転座、または何らかの他の機構による、正常な細胞遺伝子産物の定性的変化から、または遺伝子発現の定量的改変から生じると考えられている（Gelmannら、前出）。特定の遺伝子の変異または変更された発現が、他の組織および他の細胞型の中でも、いくつかの白血病の病因と関与するようである（Gelmannら、前出）。実際、いくつかの動物新形成に関与する癌遺伝子のヒト対応物は、ヒトの白血病および癌のいくつかの症例において増幅または転座されている（Gelmannら、前出）。

【 0 3 0 7 】

例えば、c-myc発現は、非リンパ球性白血病細胞株HL-60において高度に増幅される。HL-60細胞が増幅を止めるように化学的に誘導される場合、c-mycのレベルは、ダウンレギュレートされることが見出される（国際公開番号WO91/15580号）。しかし、c-mycまたはc-mybの5'

末端に相補的であるDNA構築物へのHL-60細胞の暴露が、c-mycタンパク質またはc-mybタンパク質の発現をダウンレギュレートする対応するmRNAの翻訳をブロックし、処理した細胞の細胞増殖および分化の停止を引き起こすことが示されている（国際公開番号WO91/15580号；Wickstromら、Proc. Natl. Acad. Sci. 85:1028（1988）；Anfossiら、Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3379（1989））。しかし、当業者は、増殖表現型を示すことが公知である種々の起源の多数の細胞および細胞型を考慮すれば、本発明の有用性が造血性の細胞および組織の増殖性障害の処置に限定されないことを認識する。

【0308】

上記に加えて、本発明のポリヌクレオチドは、三重らせん形成を通して、またはアンチセンスDNAもしくはRNAを通して遺伝子発現を制御するために使用され得る。アンチセンス技術は、例えば、Okano, J. Neurochem. 56:560（1991）, 「Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression」, CRC Press, Boca Raton, FL（1988）において考察される。三重らせん形成は例えば、Leeら、Nucleic Acids Research 6:3073（1979）；Cooneyら、Science 241:456（1988）；およびDervanら、Science 251:1360（1991）において考察される。両方の方法は、相補的DNAまたは相補的RNAへのポリヌクレオチドの結合に依存する。これらの技術に関して、好ましいポリヌクレオチドは通常、20～40塩基長のオリゴヌクレオチドであり、そして転写に関与する遺伝子領域（三重らせん-Leeら、Nucleic Acids Res. 6:3073（1979）；Cooneyら、Science 241:456（1988）；およびDervanら、Science 251:1360（1991）を参照のこと）またはmRNA自体（アンチセンス-Okano, J. Neurochem. 56:560（1991）；Oligodeoxy-nucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, C

R C Press, Boca Raton, FL (1988)) のいずれかに相補的である。三重らせん形成は、最適にはDNAからのRNA転写の遮断を生じるが、アンチセンスRNAハイブリダイゼーションは、ポリペプチドへのmRNA分子の翻訳を阻止する。上記のオリゴヌクレオチドはまた、アンチセンスRNAまたはDNAが、インビボで発現されて本発明の抗原のポリペプチド産生を阻害し得るように細胞に送達され得る。両方の技術は、モデル系において効果的であり、そして本明細書に開示される情報は、疾患を処置するための試みにおいて、特に、増殖性疾患および／または状態の処置のために、アンチセンスまたは三重らせんポリヌクレオチドを設計するために使用され得る。

【 0 3 0 9 】

本発明のポリヌクレオチドはまた、遺伝子治療において有用である。遺伝子治療の1つの目標は、遺伝欠損を修正する試みにおいて、欠損遺伝子を有する生物へ正常遺伝子を挿入することである。本発明に開示されるポリヌクレオチドは、高度に正確な様式でこのような遺伝欠損を標的とする手段を提供する。別の目標は、宿主ゲノム中には存在しなかった新しい遺伝子を挿入し、それによって宿主細胞中に新しい形質を生成することである。

【 0 3 1 0 】

ポリヌクレオチドはまた、微小な生物学的サンプルから個体を同定するために有用である。例えば、米国軍は、その職員を同定するために制限フラグメント長の多型性 (RFLP) の使用を考慮している。この技術において、個体のゲノムDNAは1つ以上の制限酵素で消化され、そして職員を同定するため固有なバンドを生じるためのサザンブロットについてプローブされる。この方法は、「認識票 (Dog tag)」 (これは、失われたり、交換されたり、または盗まれたりすることにより、ポジティブな同定を困難にし得る) の現在の限界を受けない。本発明のポリヌクレオチドは、RFLPのためのさらなるDNAマーカーとして使用され得る。

【 0 3 1 1 】

本発明のポリヌクレオチドはまた、個体のゲノムの選択された部分の実際の塩基ごとのDNA配列を決定することによって、RFLPに対する代替物として使

用され得る。これらの配列は、このような選択されたDNAを増幅しそして単離するためにPCRプライマーを調製するために使用され得、次いで、この選択されたDNAは、配列決定され得る。各個体が固有のセットのDNA配列を有するので、この技術を使用して、個体が同定され得る。一旦、固有のIDデータベースが個体について確立されると、その個体が生存していようとまたは死亡していようとにかかわらず、その個体のポジティブ同定が、極めて小さな組織サンプルからなされ得る。

【 0 3 1 2 】

法医学生物学もまた、本明細書に開示されるようなDNAに基づく同定技術を使用して利益を得る。組織（例えば、髪または皮膚）、または体液（例えば、血液、唾液、精液、滑液、羊水、乳汁、リンパ、肺痰（pulmonary sputum）またはサーファクタント、尿、糞便物質など）のような非常に小さな生物学的サンプルから得られたDNA配列は、PCRを使用して増幅され得る。ある先行技術において、DQaクラスII HLA遺伝子のような多型性遺伝子座から増幅された遺伝子配列は、個体を同定するための法医学生物学において使用される。（Erllich, H., PCR Technology, Freeman and Co. (1992)）。一旦、これらの特異的多型性遺伝子座が増幅されると、これらは1つ以上の制限酵素で消化される。これは、DQaクラスII HLA遺伝子に対応するDNAでプローブされたサザンブロットについてのバンドの同定セットを生じる。同様に、本発明のポリヌクレオチドは、法医学的目的のための多型性マーカーとして使用され得る。

【 0 3 1 3 】

また、特定の組織の供給源を同定し得る試薬についての必要性が存在する。例えば、未知の起源の組織が提供される場合、法医学においてこのような必要性が生じる。適切な試薬は、例えば、本発明の配列から調製される、前立腺または前立腺癌ポリヌクレオチドに特異的なDNAプローブまたはプライマーを含み得る。このような試薬のパネルは、種および／または器官型によって組織を同定し得る。同様の様式で、これらの試薬は、夾雑物について組織培養物をスクリーニングするために使用され得る。

【 0 3 1 4 】

本発明のポリヌクレオチドはまた、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のためのハイブリダイゼーションプローブとして有用である。同様に、本発明のポリペプチドに関するポリペプチドおよび抗体は、組織（例えば、免疫組織化学アッセイ）または細胞型（例えば、免疫細胞学アッセイ）の示差的同定のための免疫学的プローブを提供するのに有用である。さらに、「標準」遺伝子発現レベル（すなわち、障害を有しない個体からの健康組織の発現レベル）と比較して、上記の組織または細胞の多くの障害に対して、本発明のポリヌクレオチド／ポリペプチドの有意に高いかまたは低いレベルの遺伝子発現が、例えば、障害を有する個体から採取された特定の組織（例えば、本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドを発現する組織、および／または癌性組織および／または創傷組織）または体液（例えば、漿液、血漿、尿、滑液または髄液）において検出され得る。

【 0 3 1 5 】

従って、本発明は、以下の工程を含む障害の診断方法を提供する：（a）個体の細胞または体液中の遺伝子発現レベルをアッセイする工程；（b）標準的な遺伝子発現レベルと、この遺伝子発現レベルを比較し、それにより、標準の発現レベルと比較して、アッセイされた遺伝子発現レベルの増加または減少が障害を示す、工程。

【 0 3 1 6 】

少なくとも、本発明のポリヌクレオチドは、サザンプロットのゲル上の分子量マーカーとして、特定の細胞型における特異的mRNAの存在についての診断プローブとして、新規のポリヌクレオチドを発見するプロセスにおける「減算した（*subtract-out*）」公知の配列に対するプローブとして、「遺伝子チップ」または他の支持体に付着するためのオリゴマーを選択および作製するために、DNA免疫技術を用いて抗DNA抗体を惹起するために、および免疫応答を惹起する抗原として使用され得る。

【 0 3 1 7 】

（ポリペプチドの使用）

本明細書中で同定される各々のポリペプチドは、多くの方法において使用され得る。以下の記述は、例示として考慮されるべきであり、そして公知の技術を利用する。

【 0 3 1 8 】

本発明のポリペプチドに指向されるポリペプチドおよび抗体は、組織（例えば、A B C免疫ペルオキシダーゼのような免疫組織化学アッセイ（H s uら、J . H i s t o c h e m . c y t o c h e m . 2 9 : 5 7 7 - 5 8 0 (1 9 8 1) ）または細胞型（例えば、免疫細胞化学アッセイ）の差次的同定のための免疫学的プローブを提供するために有用である。

【 0 3 1 9 】

抗体を使用して、当業者に公知の古典的な免疫組織学的な方法を用いて、生物学的サンプル中の本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのレベルをアッセイし得る。（例えば、J a l k a n e nら、J . C e l l . B i o l . 1 0 1 : 9 7 6 - 9 8 5 (1 9 8 5) ; J a l k a n e nら、J . C e l l . B i o l . 1 0 5 : 3 0 8 7 - 3 0 9 6 (1 9 8 7) を参照のこと）。タンパク質の遺伝子発現を検出するのに有用な、他の抗体に基づく方法には、イムノアッセイ（例えば、酵素結合イムノソルベントアッセイ（E L I S A）およびラジオイムノアッセイ（R I A））が含まれる。適切な抗体アッセイの標識は、当該分野で公知であり、そして酵素標識（例えば、グルコースオキシダーゼ）；放射性同位体（例えば、ヨウ素（ ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ $^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{112}In 、 ^{111}In ）、およびテクネチウム（ ^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、タリウム（ ^{201}Tl ）、ガリウム（ ^{68}Ga 、 ^{67}Ga ）、パラジウム（ ^{103}Pd ）、モリブデン（ ^{99}Mo ）、キセノン（ ^{133}Xe ）、フッ素（ ^{18}F ）、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{176}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru ；発光標識（例えば、ルミノール）；ならびに蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）ならびにビオチンが挙げられる。

【0320】

生物学的サンプル中の本発明のポリペプチドのレベルをアッセイすることに加えて、タンパク質はまた、画像化によりインビボで検出され得る。タンパク質のインビボ画像化のための抗体の標識またはマーカは、X線撮影法、NMR、またはESRにより検出可能なものを含む。X線撮影法のために適切な標識は、放射性同位体（例えば、バリウムまたはセシウム）を含み、これは検出可能な放射線を放射するが、被験体に対して明らかに有害ではない。NMRおよびESRのための適切なマーカは、検出可能な特徴的なスピンを有するマーカ（例えば、重水素）を含み、これは、関連するハイブリドーマのための栄養分を標識することにより抗体中に取り込まれ得る。

放射性同位体（例えば、 ^{131}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $(^{131}\text{I}$ 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 $^{124}\text{I})$ 、炭素(^{14}C)、硫黄(^{35}S)、トリチウム(^3H)、インジウム($^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、およびテクネチウム(^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、タリウム(^{201}Tl)、ガリウム(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、パラジウム(^{103}Pd)、モリブデン(^{99}Mo)、キセノン(^{133}Xe)、フッ素(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru)、放射線不透過性物質、または核磁気共鳴により検出可能な材料のような適切な検出可能な画像化部分で標識された、タンパク質特異的抗体または抗体フラグメントは、免疫系の障害について検査されるべき哺乳動物に（例えば、非経口的、皮下、または腹腔内に）導入される。被験体のサイズおよび用いられる画像化システムは、診断画像を生成するために必要な画像化部分の量を決定することが当該分野で理解される。放射性同位体部分の場合には、ヒト被験体について、注射される放射能の量は、通常、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の約5～20ミリキュリーの範囲である。次いで、標識された抗体または抗体フラグメントは、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを発現する細胞の位置に優先的に蓄積される。インビボ腫瘍画像化は、S. W. Burchielら、「Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies

s and Their Fragments」(Tumor Imaging : The Radiochemical Detection of Cancer)の第13章、S. W. BurchielおよびB. A. Rhodes編、Masson Publishing Inc. (1982))に記載される。

【0321】

1つの実施形態において、本発明は、異種ポリペプチドまたは核酸と会合する本発明のポリペプチド（例えば、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドおよび／または抗体）を投与することによる、本発明の組成物の細胞への特異的な送達のための方法を提供する。1つの例において、本発明は、治療タンパク質を標的化細胞中へ送達するための方法を提供する。別の例において、本発明は、一本鎖核酸（例えば、アンチセンスまたはリボザイム）または二本鎖核酸（例えば、細胞のゲノムに組み込み得るか、またはエピソードにて複製し得、そして転写され得るDNA）を、標的化細胞に送達するための方法を提供する。

【0322】

別の実施形態において、本発明は、毒素または細胞傷害性プロドラッグに関連する本発明のポリペプチドを投与することによる細胞の特異的な破壊（例えば、腫瘍細胞の破壊）のための方法を提供する。

【0323】

「毒素」とは、内因性の細胞傷害性エフェクタ系、放射性同位体、ホロ毒素（holotoxin）、改変型毒素、毒素の触媒サブユニット、または規定の条件下で細胞死を引き起こす細胞中もしくは細胞表面には通常存在しない任意の分子もしくは酵素を結合および活性化する1つ以上の化合物を意味する。本発明の方法に従って使用され得る毒素としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：当該分野で公知の放射性同位体、固有のまたは誘導された内因性の細胞傷害性エフェクタ系に結合する化合物（例えば、抗体（またはその補体固定含有部分））、チミジンキナーゼ、エンドヌクレアーゼ、RNAse、 α 毒素、リシン、アブリン、Pseudomonas外毒素A、ジフテリア毒素、サボリン、モモルジン（momordin）、ゲロニン（gelonin）、ヤマゴボウ抗

ウイルスタンパク質、 α サルシン (sarcin) およびコレラ毒素。「毒素」はまた、細胞分裂停止剤もしくは細胞破壊剤、治療薬または放射活性金属イオン (例えば、 α -放射体 (例えば、 ^{213}Bi)) もしくは他の放射性同位体 (例えば、 ^{103}Pd 、 ^{133}Xe 、 ^{131}I 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{153}Sm 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 、 90 イットリウム、 117 スズ、 18 レニウム、 166 ホルミウム、および 188 レニウム) ; 発光標識 (例えば、ルミノール) ; および蛍光標識 (例えば、フルオレセインおよびローダミン)、ならびにビオチンを含む。

【0324】

当該分野において公知の技術は、本発明のポリペプチド (抗体を含む) を標識化するために適用され得る。このような技術としては、二官能性結合剤の使用 (例えば、米国特許第5,756,065号; 同第5,714,631号; 同第5,696,239号; 同第5,652,361号; 同第5,505,931号; 同第5,489,425号; 同第5,435,990号; 同第5,428,139号; 同第5,342,604号; 同第5,274,119号; 同第4,994,560号; および同第5,808,003号を参照のこと; これら各々の内容は、本明細書中に参考としてその全体を援用する) が挙げられるが、これに限定されない。

【0325】

従って、本発明は、障害の診断方法を提供し、これは以下を含む: (a) 個体の細胞または体液における本発明のポリペプチドの発現レベルをアッセイする工程; および (b) アッセイされたポリペプチドの発現レベルを標準のポリペプチドの発現レベルと比較し、それによって標準の発現レベルと比較してアッセイされたポリペプチドの発現レベルにおける増加または減少が障害を示す工程。癌に関しては、個体由来の生検された組織中の相対的に高い量の転写物の存在は、疾患の発症の素因を示し得るか、または実際の臨床的な症状が明らかとなる前に疾患を検出するための手段を提供し得る。より決定的なこのタイプの診断は、保健専門家がより早く予防策または積極的な処置を使用し、それによって癌の発症ま

たはさらなる進行を防ぐことを可能にし得る。

【 0 3 2 6 】

さらに、本発明のポリペプチドを用いて疾患または状態（例えば、神経障害、免疫系障害、筋肉障害、生殖障害、胃腸障害、肺障害、心血管障害、腎臓障害、増殖障害ならびに／または癌性疾患および状態など）を処置または予防し得る。例えば、患者は、ポリペプチドの非存在またはレベルの減少を元に戻すこと（例えば、インスリン）、異なるポリペプチドの不在またはレベルの減少を補充すること（例えば、ヘモグロビンBに対するヘモグロビンS、SOD、カタラーゼ、DNA修復タンパク質）、ポリペプチドの活性を阻害すること（例えば、癌遺伝子または腫瘍抑制因子）、ポリペプチドの活性を活性化すること（例えば、レセプターに結合することによって）、遊離リガンドについて膜結合レセプターと競合させることによって膜結合レセプターの活性を減少させること（例えば、炎症を低減させる際に用いられる可溶性TNFレセプター）、または所望の応答をもたらすこと（例えば、血管の成長の阻害、増殖細胞または組織に対する免疫応答の増強）の試みにおいて、本発明のポリペプチドが投与され得る。

【 0 3 2 7 】

同様に、本発明のポリペプチドに対して指向される抗体もまた用いられ、疾患（上記、および本明細書中のどこかに記載されるような）を処置し得る。例えば、本発明のポリペプチドに対して指向される抗体の投与には、ポリペプチドを結合して、そして／またはポリペプチドを中和し、そして／またはポリペプチドの過剰産生を低減し得る。同様に、抗体の投与は、例えば、膜に結合したポリペプチド（レセプター）へ結合することにより、ポリペプチドを活性化し得る。

【 0 3 2 8 】

少なくとも、本発明のポリペプチドは、当業者に周知の方法を用いるSDS-PAGEゲルまたは分子ふるいゲル濾過カラムの分子量マーカーとして使用され得る。宿主細胞の形質転換を評価する方法として、ポリペプチドがまた用いられ、抗体を惹起し得、次いで、この抗体が使用され、組換え細胞からのタンパク質発現を測定する。さらに、本発明のポリペプチドが使用され、以下の生物学的活性を試験し得る。

【 0 3 2 9 】

(診断アッセイ)

本発明の組成物は、哺乳動物（好ましくは、ヒト）における様々な障害の診断、処置、予防および／または予後に有用である。このような障害は、神経性疾患（例えば、以下の「神経活性および神経性疾患」に記載される）、免疫系障害（例えば、以下の「免疫活性」に記載される）、筋障害（例えば、以下の「神経活性および神経性疾患」に記載される）、生殖障害（例えば、以下の「抗新脈管形成活性」に記載される）、肺障害（例えば、以下の「免疫活性」に記載される）、心臓血管障害（例えば、以下の「心臓血管障害」に記載される）、感染性疾患（例えば、以下の「感染性疾患」に記載される）、増殖性障害（例えば、以下の「過剰増殖性障害」、「抗新脈管形成活性」および「細胞レベルの疾患」に記載される）、および／または癌性疾患および状態（例えば、以下の「過剰増殖性障害」、「抗新脈管形成活性」および「細胞レベルの疾患」に記載される）を含むが、これらに限定されない。

【 0 3 3 0 】

P T P a s e タンパク質は、サイトカイン応答に関する生物学的活性に関与すると考えられている。したがって、本発明の組成物（ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび本発明の抗体およびフラグメントおよびこれらの改変体）は、異常な P T P a s e 活性に関する疾患および／または障害の診断、予後、予防および／または処置に利用され得る。

【 0 3 3 1 】

好ましい実施形態において、本発明の組成物（本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体を、ならびにこれらのフラグメントおよび改変体を含む）は、組織治癒障害（例えば、および／または本明細書中の表題「創傷治癒および上皮細胞増殖」の章に記載されるようなもの）、神経突起成長（例えば、および／または本明細書中の表題「神経活性および神経学的疾患」の章に記載されるようなもの）、細胞接着障害および異常な細胞シグナル伝達に関連する疾患および／または障害の診断、予後、予防および／または処置において使用され得る。

【 0 3 3 2 】

別の実施形態において、本発明のポリペプチド、またはこのポリペプチドに対応するポリヌクレオチド、抗体、アゴニストもしくはアンタゴニストは、本発明のポリペプチドが発現される組織に関連する障害の診断、予後、予防および／または処置のために使用され得、この組織としては、「本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド」に開示される組織、および／または表3、2列（ライブラリコード）に開示される1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上の組織が挙げられる。

【0333】

多くの障害について、「標準」PTPase遺伝子発現レベル（障害を有しない個体から採取された組織または体液におけるPTPase発現レベル）に比べ、PTPase遺伝子発現の実質的に変化した（増加または減少）レベルは、このような障害を有する個体から採取された組織、細胞または体液（例えば、血清、血漿、尿、精液、滑液または髄液）において検出され得る。したがって、本発明は、障害の診断に有用な診断方法を提供し（個体由来の組織、細胞または体液におけるPTPASEポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを測定することおよび標準PTPase遺伝子発現レベルと測定した遺伝子発現レベル比較することを含む）、これによって標準に比べて増加または減少した遺伝子の発現レベルがPTPase障害の指標となる。これらの診断アッセイは、例えば、血液サンプル、生検または剖検のような、インビボまたはインビトロにおいて実施され得る。

【0334】

本発明は、予後の指示薬として有用であり、これによって、減少したPTPase遺伝子発現を示す患者は、標準に近いレベルで遺伝子が発現する患者と比較して、より悪い臨床結果を経験する。

【0335】

「PTPaseポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルをアッセイすることによって、第1の生物学的サンプルにおけるPTPaseポリペプチドのレベルあるいはPTPaseポリペプチドをコードするmRNAのレベルを、直接的（例えば、完全なタンパク質レベルまたはmRNAレベルを決定または推

定することによる) または相対的 (例えば、第2の生物学的サンプルにおける PTPase ポリペプチドレベルまたは mRNA レベルと比較することによる) のいずれかで、定性的または定量的に、測定または推定することが意図される。好ましくは、第1の生物学的サンプルにおける PTPase ポリペプチドレベルまたは mRNA レベルは、測定されるかまたは推定され、そして標準の PTPase ポリペプチドレベルまたは mRNA レベルと比較される。標準は、癌を有さない個体から得られた第2の生物学的サンプルから得られ、または障害を有しない個体の集団由来の平均レベルによって決定された。当該分野で認識されるように、一旦標準の PTPase ポリペプチドレベルまたは mRNA レベルが知られると、これは、比較のための標準として繰り返し使用され得る。

【 0 3 3 6 】

「生物学的サンプル」によって、PTPase ポリペプチド (それらの部位を p 含む) または mRNA を含有する個体、細胞株、組織培養物または他の供給源から得られた任意の生物学的サンプルが意図される。示されるように、生物学的サンプルは、全長 PTPase ポリペプチドまたはそれらのフラグメントを含む体液 (例えば、血清、血漿、尿、滑液、および髄液)、ならびに全長 PTPase ポリペプチドまたはそれらのフラグメントを発現することが見出された他の組織供給源を包含する。哺乳動物から組織生検および体液を得るための方法は、当該分野で周知である。

【 0 3 3 7 】

細胞総 RNA は、Chomczynski および Sacchi、Anal. Biochem. 162 : 156 - 159 (1987) に記載される一工程グアニジンチオシアネートフェノールクロロホルム法を使用して生物学的サンプルから単離され得る。次いで、PTPase ポリペプチドをコードする mRNA のレベルは、任意の適切な方法を使用してアッセイされる。これらには、ノーザンブロット分析 (Harada ら、Csil 63 : 303 - 312 (1990))、S1ヌクレアーゼマッピング (Fujita ら、Cell 49 : 357 - 367 (1987))、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、ポリメラーゼ連鎖反応と組み合わせた逆転写 (RT-PCR) (Makino ら、Techniq

ue 2 : 295 - 301 (1990)) 、およびリガーゼ連鎖反応と組み合わせた逆転写 (R T - L C R) が挙げられる。

【 0 3 3 8 】

本発明はまた、生物学的サンプル（例えば、細胞および組織）において、例えば、定量的な診断アッセイおよび P T P a s e ポリペプチドにレベル検出についての診断アッセイに関連し、正常および異常ポリペプチドレベルの検出を含む。したがって、例えば、正常コントロール組織サンプルに比して過剰に発現した P T P a s e ポリペプチドの検出について、本発明に従う診断アッセイが用いて、腫瘍の存在を検出し得る。宿主由来のサンプルにおける本発明の P T P a s e ポリペプチドのようなポリペプチドのレベルを検出するために用いられ得るアッセイ技術は、当業者において周知である。このようなアッセイ方法は、放射免疫測定、競合結合アッセイ、ウェスタンブロット分析および E L I S A アッセイを含む。生物学的サンプルにおける P T P a s e ポリペプチドのアッセイは、当該分野で公知の任意の方法を用いて、実施され得る。

【 0 3 3 9 】

生物学的サンプル中の P T P a s e ポリペプチドレベルのアッセイは、抗体に基づく技術を用いて起こり得る。例えば、組織における P T P a s e ポリペプチドのポリペプチドの発現は、古典的な免疫組織学的方法で研究され得る (J a l k a n e n ら、J . C e l l . B i o l . 101 : 976 - 985 (1985) ; J a l k a n e n , M . ら、J . C e l l . B i o l . 105 : 3087 - 3096 (1987)) 。 P T P a s e ポリペプチドの遺伝子発現を検出するための有用な他の抗体に基づく方法としては、イムノアッセイ（例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) およびラジオイムノアッセイ (R I A) ）が挙げられる。適切な抗体アッセイの標識は、当該分野において公知であり、そしてグルコースオキシダーゼのような酵素標識、ならびに放射性同位元素（例えば、ヨウ素 (125 I 、 123 I) 、炭素 (14 C) 、イオウ (35 S) 、トリチウム (3 H) 、インジウム (111 I n) 、およびテクネチウム (99m T c) 、ならびに蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）ならびにビオチン）が挙げられる。

【 0 3 4 0 】

分析される組織または細胞型としては、一般的に、PTPase遺伝子を発現することが既知かまたは疑われる組織または細胞型（例えば、癌）が挙げられる。本明細書中で使用されるタンパク質の単離方法は、例えば、HarlowおよびLane（Harlow, E. およびLane, D., 1988, 「Antibodies: A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York）（これは、本明細書中においてその全体で参考として援用される）に記載されるものであり得る。単離された細胞は、細胞培養物または患者由来であり得る。培養物から採取された細胞の分析は、細胞に基づく遺伝子治療技術の一部として使用され得る細胞の評価において、あるいはPTPase遺伝子の発現に対する化合物の効果を試験するために必要な工程であり得る。

【 0 3 4 1 】

例えば、本明細書中に記載されるような抗体、または抗体のフラグメントが、PTPase遺伝子産物または保存的改変体またはそのペプチドフラグメントの存在を定量的または定性的に検出するために使用され得る。例えば、これは、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、または蛍光計検出に接続される蛍光標識された抗体を使用する免疫蛍光技術によって達成され得る。

【 0 3 4 2 】

好ましい実施形態において、PTPaseポリペプチドの予測されるエピトープドメインの1つもしくは全てに対して検出可能な抗体、または抗体のフラグメントは、PTPase遺伝子産物もしくは保存された改変体もしくはそれらのペプチドフラグメントの存在を、定量的または定性的に検出するために、使用され得る。これは、例えば、蛍光標識された抗体を使用した免疫蛍光技術によって、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、または蛍光計検出を用いて達成され得る。

【 0 3 4 3 】

さらなる好ましい実施形態において、PTPaseポリペプチドの構造エピトープに対する抗体または抗体のフラグメントは、PTPase遺伝子産物もしくは

は保存された改変体もしくはそれらのペプチドフラグメントの存在を、定量的または定性的に検出するために、使用され得る。これは、例えば、蛍光標識された抗体を使用した免疫蛍光技術によって、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、または蛍光計検出を用いて達成され得る。

【 0 3 4 4 】

本発明の抗体（またはそのフラグメント）および／またはPTPaseのポリペプチドは、さらに、PTPase遺伝子産物もしくは保存的改変体またはそのペプチドフラグメントのインサイチュで検出のために、免疫蛍光、免疫電子顕微鏡または非免疫学的アッセイとして組織学的に使用され得る。インサイチュ検出は、患者から組織学的試料を取り出し、そしてそこに本発明の標識された抗体またはPTPaseポリペプチドを適用することによって達成され得る。抗体（またはフラグメント）またはPTPaseポリペプチドは、好ましくは、標識された抗体（またはフラグメント）を生物学的サンプルに重ねることによって適用される。このような手順の使用によって、PTPase遺伝子産物、または保存的改変体またはペプチドフラグメントの存在、またはPTPaseポリペプチドの結合のみだけではなく、試験された組織におけるその分布をも決定し得る。本発明を使用して、当業者は、任意の広範な種々の組織学的方法（例えば、染色手順）がこのようなインサイチュ検出を達成するために改変され得ることを容易に認知する。

【 0 3 4 5 】

PTPase遺伝子産物または保存的改変体またはそのペプチドフラグメントのイムノアッセイおよび非イムノアッセイは、代表的に、ニュートロカイン α 遺伝子産物または保存的改変体またはそのペプチドフラグメントに結合し得る検出可能に標識された抗体の存在下で、サンプル（例えば、生物学的流体、組織抽出物、新鮮に収集された細胞、または細胞培養物中でインキュベートされた細胞の溶解物）をインキュベートする工程、および結合された抗体を当該分野で周知の任意の多くの技術によって検出する工程を包含する。

【 0 3 4 6 】

生物学的サンプルは、固相支持体またはキャリア（例えばニトロセルロース）

、あるいは細胞、細胞粒子または可溶性タンパク質を固定化し得る他の固体支持体に接触され、そして固定化され得る。次いで、この支持体は、適切な緩衝液で洗浄され得、続いて検出可能に標識された抗 P T P a s e 抗体または検出可能な P T P a s e ポリペプチドで処理される。次いで、固相支持体は、結合していない抗体またはポリペプチドを除くために、緩衝液で2回洗浄され得る。必要に応じて、抗体は、続いて標識される。次いで、固体支持体上に結合された標識の量が従来の手段によって検出され得る。

【 0 3 4 7 】

「固相支持体またはキャリア」によって、抗原または抗体を結合し得る任意の支持体を意図する。周知の支持体またはキャリアには、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、斑レイ岩、および磁鉄鉱が挙げられる。キャリアの性質は、本発明の目的のために、ある程度可溶性であるかまたは不溶性のいずれかであり得る。支持体材料は、結合された分子が抗原または抗体に結合し得る限り、実質的に任意の可能な構造的形状を有し得る。従って、支持体の形状は、球形（ビーズのような）、または円筒形（試験管の内側表面または棒の外側表面のような）であり得る。あるいは、表面は、シート、試験ストリップなどのように平坦であり得る。好ましい支持体には、ポリスチレンビーズが挙げられる。当業者は、抗体または抗原を結合するための多くの他の適切なキャリアを知っているか、または慣用的な実験の使用によってこれを確認し得る。

【 0 3 4 8 】

所与の多くの抗 P T P a s e ポリペプチド抗体また P T P a s e 抗原ポリペプチドの結合活性は、周知の方法に従って決定され得る。当業者は、慣用的な実験を使用することによって、各決定のために、操作条件および最適のアッセイ条件を決定し得る。

【 0 3 4 9 】

個体から得られる生物学的サンプルにおける P T P a s e ポリペプチドレベルまたはポリヌクレオチドレベルをアッセイすることに加えて、P T P a s e ポリペプチドまたはポリヌクレオチドはまた、イメージングによってインビボで検出

され得る。例えば、本発明の1つの実施形態において、PTPaseポリペプチドならびに／あるいは抗PTPase抗原抗体は、新生物のような疾患細胞をイメージングするために使用される。別の実施形態において、本発明のPTPaseヌクレオチド（例えば、特定のPTPase mRNA転写物の全てまたは一部に相補的なポリヌクレオチド）ならびに／あるいは抗PTPase抗体（例えば、本発明のPTPaseポリペプチドのエピトープの任意の1つもしくは組み合わせを検出する抗体、本発明のPTPaseポリペプチドの構造エピトープを検出する抗体、または哺乳類動物細胞の細胞表面上に発現する全長ポリペプチドを検出する抗体）が、疾患細胞または新生物細胞をイメージングするために使用される。

[0 3 5 0]

PTPaseポリペプチドのインビボイメージングのための抗体標識またはマーカ－には、X線ラジオグラフィー、NMR、MRI、CAT走査またはESRによって検出可能なものが挙げられる。X線ラジオグラフィーについては、適切な標識は、検出可能な放射線を放射するが、被験体に対して明白には有害ではないバリウムまたはセシウムのような放射性同位体を含む。NMRおよびESRに適切なマーカ－には、重水素のような検出可能な特徴的なスピンを有するものが含まれ、これは、関連したハイブリドーマのための栄養素を標識することにより抗体に取り込まれ得る。インビボイメージングが、ヒトにおける診断のためにPTPaseポリペプチドの増加したレベルを検出するために使用される場合、ヒト抗体または「ヒト化」キメラモノクローナル抗体を使用することが好適であり得る。このような抗体は、本明細書中に記載される技術またはそうでなければ当該分野で公知の技術を使用して産生され得る。例えば、キメラ抗体を産生するための方法は、当該分野で公知である。（総説については、Morrison, Science 229:1202 (1985); Oiら、BioTechniques 4:214 (1986); Cabilllyら、米国特許第4,816,567号; Taniguchiら、EP 171496; Morrisonら、EP 173494; Neubergerら、WO 8601533; Robinsonら、WO 8702671; Boulianneら、Nature 3

12:643 (1984); Neubergerら、Nature 314:268 (1985)を参照のこと)。

【0351】

さらに、存在が検出され得る任意の本発明のPTPaseポリペプチドが、投与され得る。例えば、放射線不透過性または他の適切な化合物で標識されたPTPaseポリペプチドは、標識化抗体について上で議論したように、インビボで投与され、そして可視化され得る。さらに、このようなPTPaseポリペプチドは、インビボ診断手順のために利用され得る。

【0352】

放射性同位体（例えば、 ^{131}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、放射線不透過物質、または核磁気共鳴によって検出可能な物質のような、適切な検出可能なイメージング部分で標識された、PTPaseポリペプチドに特異的な抗体または抗体フラグメントが、障害について試験するために、哺乳動物に（例えば、非経口的に、皮下的に、または腹腔内に）導入される。被験体の大きさおよび使用されるイメージングシステムが、診断的イメージングを生成するために必要とされるイメージング部分の量を決定することが、当該分野で理解される。放射性同位体部分の場合には、ヒト被験体について、注射される放射能の量は、通常、約5～20ミリキュリーの $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の範囲である。次いで、標識された抗体または抗体フラグメントは、PTPaseタンパク質を含む細胞の位置に優先的に蓄積される。インビボ腫瘍イメージングは、S. W. Burchielら、「Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments」(Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancerの第13章、The Radiochemical Detection of Cancer、S. W. BurchielおよびB. A. Rhodes編、Masson Publishing Inc. (1982)に記載される。

【0353】

抗体に関して、抗PTPaseポリペプチド抗体が検出可能に標識され得る方

法の1つは、これをレポーター酵素に連結し、そしてエンザイムイムノアッセイ (EIA) における連結産物を使用することによる (Voller, A., 「The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)」, 1978, Diagnostic Horizons 2: 1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Vollerら, J. Clin. Pathol. 31: 507-520 (1978); Butler, J. E., Meth. Enzymol. 73: 482-523 (1981); Maggio, E. (編), 1980, Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL.; Ishikawa, E. ら, (編), 1981, Enzyme Immunoassay, Kagaku Shoin, Tokyo)。抗体に結合するレポーター酵素は、適切な基質、好ましくは、発色性基質と、例えば、分光測光的手段、蛍光測定的手段、または視覚的手段によって検出可能な化学的部分を生成するような様式で反応する。抗体を検出可能に標識するために使用され得るレポーター酵素には、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、 δ -5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 α -グリセロリン酸、デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、この検出は、レポーター酵素に対する発色性基質を使用する比色法によって達成され得る。検出はまた、同様に調製された標準との比較における基質の酵素反応の程度についての視覚的比較によって達成され得る。

【0354】

検出はまた、任意の種々の他のイムノアッセイを使用して達成され得る。例えば、抗体または抗体フラグメントを放射性標識することによって、ラジオイムノアッセイ (RIA) のを通じて PTPase ポリペプチドを検出し得る (例えば

、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, 1986年3月を参照のこと；これは、本明細書中で参考として援用される）。放射性同位体は、 γ 線計数器、シンチレーション計数管、またはオートラジオグラフィーを含むが、これらに限定されない手段によって検出され得る。

【 0 3 5 5 】

蛍光化合物で抗体を標識することがまた可能である。次いで蛍光標識された抗体を適切な波長の光に曝露する場合、その存在が、蛍光に起因して検出され得る。蛍光標識化合物に最も一般的に使用される化合物は、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン (allophycocyanin)、オプトアルデヒド (optaldehyde) およびフルオレサミンである。

【 0 3 5 6 】

抗体はまた、 ^{152}Eu またはランタン系列の他のもののような蛍光放射金属を使用して検出可能に標識され得る。これらの金属は、ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) のような金属キレート化基を使用して抗体に接着され得る。

【 0 3 5 7 】

抗体はまた、化学発光化合物に結合することによって検出可能に標識され得る。次いで、化学発光タグ化抗体の存在は、化学反応の過程の間に生じる発光の存在を検出することによって決定される。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール (isoluminol)、セロマトニックアクリジニウムエステル (theromatic acridinium ester)、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルがある。

【 0 3 5 8 】

同様に、生物発光化合物が、本発明の抗体を標識するために使用され得る。生物発光は、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を増加する生物学的システムに

おいて見出されるタイプの化学発光である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することによって決定される。標識の目的のために重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。

【 0 3 5 9 】

(疾患を検出するための方法)

一般的に、疾患は、患者から得られる生物学サンプル（例えば、血液、血清、尿、および／または組織標本）中の本発明の1つ以上のPTPaseタンパク質および／またはこのようなタンパク質をコードしているポリヌクレオチドの存在に基づいて検出される。言い換えれば、このようなタンパク質は、癌および／もしくは本明細書中の他の箇所で記載されるような疾患または障害の存在あるいは非存在を示すマーカーとして使用され得る。さらに、このようなタンパク質は、他の疾患および障害の検出のために有用であり得る。本明細書中で提供される結合試薬は一般的に、試薬に結合する生物学的サンプル中の抗原のレベルの検出を可能にする。ポリヌクレオチドプライマーおよびプローブは、PTPaseポリペプチドをコードしているmRNAのレベルを検出するために使用され得、これはまた、癌を含む疾患または障害の存在ならびに非存在を暗示する。一般的に、PTPaseポリペプチドは、正常組織中よりも少なくとも3倍高いレベルで疾患組織に存在する。

【 0 3 6 0 】

サンプル中のポリペプチドマーカーを検出するための結合試薬を使用する、当業者に公知の様々なアッセイ形態がある。例えば、HarlowおよびLane（前出）を参照のこと。一般的に、患者の中の疾患の存在または非存在は、（a）結合試薬と患者から採取された生物学的サンプル接触する工程；（b）結合試薬と結合するポリペプチドのレベルをサンプル中で検出する工程；および（c）予め測定されたcut-off値でポリペプチドのレベルを比較する工程、によって決定される。

【 0 3 6 1 】

好ましい実施形態において、アッセイは、固体支持体上で固定化され、サンプル中の残留物由来の本発明のPTPaseポリペプチドに結合させられ、そして

除去された結合試薬（単数または複数）の使用を含む。従って、結合されたポリペプチドは、レポーター基を含み、そして結合試薬／ペプチド複合体に特異的に結合する検出試薬を用いて検出され得る。このような検出試薬は、例えばポリペプチドに特異的に結合する試薬または抗体または結合試薬に特異的に結合する他の試薬（例えば、抗イムノグロブリン、プロテインG、プロテインAまたはレクチン）を含む。あるいは競争アッセイもまた利用され得、その中ではポリペプチドはレポーター基で標識され、そして結合試薬とサンプルをインキュベートした後、固定化された結合試薬へ結合することが可能になる。サンプルの成分が、標識されたポリペプチドの結合試薬への結合を阻害することに対する程度は、固定化された結合試薬とサンプルとの反応性を示す。このようなアッセイでの使用に適したポリペプチドは、上記に記載した結合試薬が結合するPTPaseポリペプチドおよびその一部、または抗体を含む。

【 0 3 6 2 】

固体支持体は、本発明のPTPaseポリペプチドが接触し得る、当該分野で公知の任意の物質であり得る。例えば、固体支持体は、マイクロタイタープレート（microtiter plate）中の試験ウェルまたはニトロセルロースまたは他の適したメンブレンであり得る。あるいは、支持体はビーズ、ディスク、（例えば、ガラスガラスファイバー）、ラテックスまたはプラスチック物質（例えば、ポリスチレンまたは塩化ポリビニル）であり得る。支持体はまた、磁性粒子または光ファイバーセンサー（例えば、米国特許第5,359,681中で開示される）であり得る。結合試薬は、当業者に公知の種々の技術（それらは、十分に特許および科学文献中で記載される）を使用して、固体支持体に固定化され得る。本発明の文脈中において、用語「固定化」は非共有結合的な結合（例えば、吸着のような）、および共有結合的な結合（それは、試薬と支持体上の官能基の間の直接的な結合であり得、または架橋試薬による結合）。マイクロタイタープレート中のウェルまたはメンブレンへの吸着による固定化が好ましい。このような場合、適したバッファー中で、適した十分な時間、結合試薬を固体支持体と接触させることによって達成される。接触時間は、温度で変化するが、代表的には約1時間および約1日である。一般的に、プラスチックマイクロタイター

プレート（例えば、ポリスチレンまたは塩化ポリビニル）のウェルを約10 ng ~ 約10 μ g、（好ましくは約100 ng ~ 約1 μ g）の範囲の量の結合試薬と結合させることは、適切な量の結合試薬を固定化するのに十分である。

【 0 3 6 3 】

一般的に、結合試薬の固体支持体への共有結合的な接触は、支持体および結合試薬上の官能基の両方と反応する2官能基試薬（例えば、ヒドロキシル基またはアミノ基）と支持体とを最初に反応させることによって達成される。例えば、結合試薬は、共有結合的に、ベンゾキノンを使用した、または結合パートナー上にアミンおよび活性水素を有する支持体上のアルデヒド基の濃縮による、適切なポリマーコーティングを有する支持体に接触され得る。（例えば、Price Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, A12-A13を参照のこと）。

【 0 3 6 4 】

（遺伝子治療方法）

本発明の別の局面は、障害、疾患および状態を処置または予防するための遺伝子治療方法である。この遺伝子治療方法は、本発明のポリペプチドの発現を達成するための、核酸（DNA、RNAおよびアンチセンスDNAまたはRNA）配列の動物への導入に関する。この方法は、標的組織によるこのポリペプチドの発現のために必要なプロモータおよび他の任意の遺伝因子と、作動可能に連結した本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを必要とする。このような遺伝子治療および送達技術は当該分野において公知である（例えば、本明細書中に参考として援用される、WO90/11092を参照のこと）。

【 0 3 6 5 】

従って、例えば、患者由来の細胞は、エキソピボで本発明のポリヌクレオチドと作動可能に連結したプロモーターを含むポリヌクレオチド（DNAまたはRNA）を用いて操作され得、次いで、操作された細胞は、本発明のポリペプチドを用いて処置される患者に提供される。このような方法は、当該分野において周知である。例えば、Bellidegrun, A. ら、J. Natl. Cancer Inst. 85:207-216 (1993); Ferrantini, M.

ら、Cancer Research 53:1107-1112 (1993) ; Ferrantini, M. ら、J. Immunology 153:4604-4615 (1994) ; Kaido, T. ら、Int. J. Cancer 60:221-229 (1995) ; Ogura, H. ら、Cancer Research 50:5102-5106 (1990) ; Santodonato, L. ら、Human Gene Therapy 7:1-10 (1996) ; Santodonato, L. ら、Gene Therapy 4:1246-1255 (1997) ; および Zhang, J. -F. ら、Cancer Gene Therapy 3:31-38 (1996) を参照のこと。これらは、本明細書中に参考として援用される。1つの実施形態においては、操作される細胞は、動脈細胞である。この動脈細胞は、動脈、動脈の周囲の組織への直接的な注射を介して、またはカテーテル注入を介して患者に再導入され得る。

【0366】

以下により詳細に考察されるように、このポリヌクレオチド構築物は、注射可能な物質を動物の細胞に送達する任意の方法（例えば、組織（心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓など）の間質空間への注射）により送達され得る。このポリヌクレオチド構築物は、薬学的に受容可能な液体または水性のキャリア中で送達され得る。

【0367】

1つの実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドは、裸のポリヌクレオチドとして送達される。用語「裸の」ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAとは、細胞への侵入を補助し、促進し、または容易にするために作用するいかなる送達ビヒクル（ウイルス配列、ウイルス粒子、リボソーム処方物、リボフェクチンまたは沈殿剤などを含む）も含まない配列をいう。しかし、本発明のポリヌクレオチドはまた、当業者に周知の方法により調製され得るリボソーム処方物中およびリボフェクチン処方物中などで送達され得る。このような方法は、例えば、米国特許第5,593,972号、同第5,589,466号および同第5,580,859号（これらは、本明細書中に参考として援用される）に記載される。

【 0 3 6 8 】

遺伝子治療方法において使用されるポリヌクレオチドベクター構築物は、好ましくは、宿主ゲノム中に組み込まれないかまたは複製を可能にする配列を含まない構築物である。適切なベクターとしては、Stratageneから入手可能なpWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG; Pharmaciaから入手可能なpSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL; ならびにInvitrogenから入手可能なpEF1/V5、pcDNA3.1、およびpRc/CMV2が挙げられる。他の適切なベクターは、当業者に容易に明らかである。

【 0 3 6 9 】

当業者に公知の任意の強力なプロモーターは、ポリヌクレオチド配列の発現を駆動するために用いられ得る。適切なプロモーターとしては、アデノウイルスプロモーター（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター）；または異種プロモーター（例えば、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター）；RSウイルス（RSV）プロモーター；誘導性プロモーター（例えば、MMTプロモーター、メタロチオネインプロモーター）；熱ショックプロモーター；アルブミンプロモーター；ApoA Iプロモーター；ヒトグロビンプロモーター；ウイルスチミジンキナーゼプロモーター（例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター）；レトロウイルスLTR；b-アクチンプロモーター；およびヒト成長ホルモンプロモーターが挙げられる。このプロモーターはまた、本発明のポリヌクレオチドについてネイティブなプロモーターであり得る。

【 0 3 7 0 】

他の遺伝子治療技術とは異なり、裸の核酸配列を標的細胞に導入する1つの主要な利点は、その細胞におけるポリヌクレオチド合成の一過性の性質である。研究によって、非複製DNA配列が細胞に導入されて、6ヶ月までの期間の間、所望のポリペプチドの産生を提供し得ることが示された。

【 0 3 7 1 】

ポリヌクレオチド構築物は、動物内の組織（筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髓、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精

巢、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺、および結合組織を包含する)の間隙空間に送達され得る。この組織の間隙空間は、器官組織の細網線維間の、細胞間の液体ムコ多糖類基質、血管または室の壁における弾性線維、線維性組織のコラーゲン線維、あるいは結合組織鞘性筋肉細胞 (c o n n e c t i v e t i s s u e e n s h e a t h i n g m u s c l e c e l l) 内または骨の裂孔中の同じ基質を包含する。これは、同様に、循環の血漿およびリンパチャンネルのリンパ液により占められた空間である。筋肉組織の間隙空間への送達は、以下で議論される理由のために好ましい。本発明のポリヌクレオチド構築物は、これらの細胞を含む組織への注射によって、好都合に送達され得る。本発明のポリヌクレオチド構築物は、好ましくは、分化した持続性の非分裂細胞に送達され、そしてその細胞において発現されるが、送達および発現は、非分化細胞または完全には分化していない細胞 (例えば、血液の幹細胞または皮膚線維芽細胞) において達成され得る。インビボでの筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、そして発現する能力において、特に適格である。

【 0 3 7 2 】

裸の核酸配列注射のために、DNAまたはRNAの有効投薬量は、約0.05 mg/kg体重から約50 mg/kg体重の範囲にある。好ましくは、この投薬量は、約0.005 mg/kgから約20 mg/kgであり、そしてより好ましくは約0.05 mg/kgから約5 mg/kgである。もちろん、当業者が認識するように、この投薬量は、注射の組織部位に応じて変化する。核酸配列の適切かつ有効な投薬量は、当業者によって容易に決定され得、そして処置される状態および投与経路に依存し得る。

【 0 3 7 3 】

好ましい投与経路は、組織の間隙空間への非経口注射経路による。しかし、他の非経口経路もまた用いられ得、これには、例えば、特に、肺または気管支の組織、咽喉または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル処方物の吸入が挙げられる。さらに、裸のDNA構築物が、血管形成術の間にこの手順において用いられるカテーテルによって動脈に送達され得る。

【 0 3 7 4 】

裸のポリヌクレオチドは、送達部位での直接の針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、およびいわゆる「遺伝子銃」を含むがこれらに限定されない、当該分野で公知の任意の方法によって送達される。これらの送達方法は、当該分野で公知である。

【 0 3 7 5 】

この構築物はまた、ウイルス配列、ウイルス粒子、リボソーム処方物、リポフェクチン、沈殿剤などのような送達ビヒクルを用いて送達され得る。このような送達方法は、当該分野で公知である。

【 0 3 7 6 】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、リボソーム調製物中で複合体化している。本発明にて使用するためのリボソーム調製物は、カチオン性（正に荷電した）、アニオン性（負に荷電した）および中性の調製物を包含する。しかしながら、カチオン性リボソームとポリアニオン性核酸との間で強固な荷電複合体を形成し得るので、カチオン性リボソームが特に好ましい。カチオン性リボソームは、機能的形態において、プラスミドDNA（本明細書中で参考として援用される、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A（1987）84：7413～7416）；mRNA（本明細書中で参考として援用される、Maloneら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A（1989）86：6077～6081）；および精製された転写因子（本明細書中で参考として援用される、Debsら、J. Biol. Chem.（1990）265：10189～10192）の細胞内送達を媒介することが示されている。

・ 【 0 3 7 7 】

カチオン性リボソームは容易に入手可能である。例えば、N[1-2, 3-ジオレイルオキシ]プロピル]-N, N, N-トリエチルアンモニウム（DOTMA）リボソームは特に有用であり、そして商標LipofectinのもとにGIBCO BRL, Grand Island, N. Y.（本明細書中で参考として援用される、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A（1987）84：7413～7416をもまた参照のこと、）より入手

可能である。他の市販のリボソームとしては、トランスフェクテース (t r a n s f e c t a c e) (D D A B / D O P E) および D O T A P / D O P E (B o e h r i n g e r) が挙げられる。

【 0 3 7 8 】

当該分野で周知の技術を使用して、他のカチオン性リボソームを、容易に入手可能な物質より調製し得る。D O T A P (1 , 2 - ビス (オレオイルオキシ) - 3 - (トリメチルアンモニオ) プロパン) リボソームの合成の記述に関して、例えば P C T 公開番号 W O 9 0 / 1 1 0 9 2 (本明細書中で参考として援用される) を参照のこと。D O T M A リボソームの調製は文献にて説明されており、例えば、本明細書中で参考として援用される、P . F e l g n e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 4 : 7 4 1 3 ~ 7 4 1 7 を参照のこと。類似した方法を使用して、他のカチオン性脂質物質よりリボソームを調製し得る。

【 0 3 7 9 】

同様に、アニオン性リボソームおよび中性リボソームは、例えば、A v a n t i P o l a r L i p i d s (B i r m i n g h a m , A l a .) から容易に入手可能であり、または容易に入手可能な物質を使用して簡単に調製され得る。そのような物質としてはとりわけ、ホスファチジルコリン、コレステロール、ホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン (D O P C) 、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (D O P G) 、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (D O P E) が挙げられる。これらの物質はまた、D O T M A 出発物資および D O T A P 出発物質と適切な割合において混合され得る。これらの物質を使用してリボソームを生成する方法は、当該分野で周知である。

【 0 3 8 0 】

例えば、商業的に、ジオレオイルホスファチジルコリン (D O P C) 、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (D O P G) 、およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (D O P E) を種々の組み合わせにおいて使用して、コレステロールを添加してもしなくても、従来のリボソームを生成し得る。従って

、例えば、超音波処理バイアル中への窒素ガス流下で、各50mgのDOPGおよびDOPCを乾燥することにより、DOPG/DOPCベシクルを調製し得る。このサンプルを一晩真空ポンプ下に置き、そして次の日、脱イオン水で水和する。次いで、浴を、15ECで循環させながら、最大設定にて、逆位カップ（浴タイプ）プローブを装備したHeat Systems モデル350超音波処理器を使用して、このサンプルを栓をしたバイアル中にて2時間超音波処理する。あるいは、負に荷電したベシクルを、超音波処理なしで調製して多重層ベシクルを生成し得るか、または核孔膜（nucleopore membrane）を通して押し出すことにより別々の大きさの単層ベシクルを生成し得る。他の方法は、当業者に公知でありそして利用可能である。

【0381】

このリボソームとしては、多重層ベシクル（MLV）、小さな単層ベシクル（SUV）または大きな単層ベシクル（LUV）が挙げられ得、SUVが好ましい。当該分野で周知の方法を使用して、種々のリボソーム-核酸複合体が調製される。例えば、本明細書中で参考として援用される、Straubingerら、Methods of Immunology（1983）、101:512～527を参照のこと。例えば、核酸を含有するMLVは、ガラスチューブの壁面にリン脂質の薄膜を堆積させ、そしてその後、カプセル化されるべき物質の溶液で水和することによって調製され得る。SUVはMLVの長期超音波処理により調製されて、単層リボソームの均質集団を生成する。封入されるべき物質を、予め形成されたMLVの懸濁液に添加し、次いで、超音波処理する。カチオン性脂質を含むリボソームを使用する場合、乾燥した脂質膜を、滅菌水または10mM Tris/NaClのような等張性緩衝溶液のような適切な溶液中に再懸濁し、超音波処理し、次いで、予め形成されたりボソームをDNAと直接混合する。正に荷電したりボソームのカチオン性DNAへの結合に起因して、リボソームおよびDNAは非常に安定な複合体を形成する。SUVは、小核酸フラグメントを用いての用途を見出す。LUVは、当該分野で周知の多くの方法により調製される。一般に使用される方法としては、Ca²⁺-EDTAキレート化（Papaadjopoulosら、Biochim. Biophys. Acta（19

75) 394:483; Wilsonら、Cell (1979) 17:77);
; エーテル注入 (Deamer, D. および Bangham, A., Biochim. Biophys. Acta (1976) 443:629; Ostroら、Biochem. Biophys. Res. Commun. (1977) 76:836; Fraleyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:3348); 界面活性剤透析 (Enoch, H. および Strittmatter, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:145); および逆相エバポレーション (REV) (Fraleyら、J. Biol. Chem. (1980) 255:10431; Szoka, F. および Papahadjopoulos, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:145; Schaefer-Ridderら、Science (1982) 215:166) が挙げられ、これらの文献は本明細書中で参考として援用される。

【0382】

一般に、DNAのリボソームに対する割合は約10:1から約1:10までである。好ましくは、その割合 (ratio) は約5:1から約1:5までである。より好ましくは、その割合は約3:1から約1:3までである。さらにより好ましくは、その割合は約1:1である。

【0383】

米国特許第5, 676, 954号 (本明細書中で参考として援用される) はカチオン性リボソームキャリアと複合体化された遺伝物質のマウスへの注入について報告する。米国特許第4, 897, 355号、同第4, 946, 787号、同第5, 049, 386号、同第5, 459, 127号、同第5, 589, 466号、同第5, 693, 622号、同第5, 580, 859号、同第5, 703, 055号および国際公開第WO94/9469号 (これらは本明細書中で参考として援用される) は、DNAを細胞および哺乳動物にトランスフェクトする際に使用するためのカチオン性脂質を提供する。米国特許第5, 589, 466号、同第5, 693, 622号、同第5, 580, 859号、同第5, 703, 055号および国際公開第WO94/9469号 (これらは本明細書中で参考として

援用される)は、DNA-カチオン性脂質複合体を哺乳動物に送達する方法を提供する。

【 0 3 8 4 】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチドをコードする配列を含むRNAを含むレトロウイルス粒子を使用して、エキソビボまたはインビボで細胞を操作する。レトロウイルスプラスミドベクターが由来し得るレトロウイルスとしては、モロニー Maus 白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、ニワトリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 3 8 5 】

このレトロウイルスプラスミドベクターを使用して、パッケージング細胞株を形質導入し、プロデューサー細胞株を形成する。トランスフェクトされ得るパッケージング細胞株の例としては、その全体が本明細書中で参考として援用される、Miller, Human Gene Therapy, 1:5~14 (1990) にて記載されるようなPE501、PA317、R-2、R-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、RCRE、RCRIP、GP+E-86、GP+envAm12およびDAN細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。このベクターは、当該分野で公知の任意の手段により、パッケージング細胞を形質導入し得る。そのような手段としては、エレクトロポレーション、リボソームの使用、およびCaPO₄沈殿が挙げられるが、それらに限定されない。1つの代替法において、このレトロウイルスプラスミドベクターをリボソームにカプセル化し得るか、または脂質に結合し得、次いで宿主に投与し得る。

【 0 3 8 6 】

このプロデューサー細胞株は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む感染性レトロウイルスベクター粒子を産生する。次いで、そのようなレトロウイルスベクター粒子を使用して、インビトロまたはインビボのどちらかで、真核生物細胞を形質導入し得る。この形質導入された真核生物細胞は、本

発明のポリペプチドを発現する。

【 0 3 8 7 】

特定の他の実施形態において、アデノウイルスベクター中に含まれるポリヌクレオチドを用いて、エキソビボまたはインビボで細胞を操作する。アデノウイルスは、それが本発明のポリペプチドをコードし、そして発現し、それと同時に通常の溶菌性ウイルス生活環にて複製するその能力に関して不活性化されるように操作され得る。アデノウイルス発現は、そのウイルスDNAの宿主細胞染色体への組み込み無しに達成され、その結果、挿入性変異誘発についての心配が軽減される。さらに、アデノウイルスは、何年もの間、腸の生ワクチンとして優れた安全側面を伴って使用されている (Schwartz, A. R. ら (1974), Am. Rev. Respir. Dis., 109: 233-238)。最終的に、アデノウイルス媒介性遺伝子移入が、コトンラットの肺への α -1-アンチトリプシンおよびCFTRの移入を含む多くの例において実証されている (Rosenfeld, M. A. ら (1991), Science, 252: 431~434; Rosenfeld ら (1992), Cell, 68: 143~155)。さらに、ヒト癌における原因物質としてアデノウイルスを確立しようとする広範な研究は、一様に否定的であった (Green, M. ら (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 6606)。

【 0 3 8 8 】

本発明において有用である適切なアデノウイルスベクターが、例えば、Kozarsky および Wilson, Curr. Opin. Genet. Devel. 3: 499~503 (1993); Rosenfeld ら, Cell 68: 143~155 (1992); Engelhardt ら, Human Gene Ther. 4: 759~769 (1993); Yang ら, Nature Genet. 7: 362~369 (1994); Wilson ら, Nature 365: 691~692 (1993); および米国特許第 5, 652, 224 号に記載されており、これらの文献および特許は本明細書中で参考として援用される。例えば、アデノウイルスベクター Ad 2 が有用であり、そしてヒト 293 細胞にて増殖され得る。これらの細胞は、アデノウイルスの E1 領域を含み、そ

して構成的にE1aおよびE1bを発現し、このことは、このベクターから欠失している遺伝子の産物を提供することによって欠損アデノウイルスを補完する。Ad2に加えて、他の多様なアデノウイルス（例えば、Ad3、Ad5、およびAd7）もまた、本発明において有用である。

【0389】

好ましくは、本発明において使用されるアデノウイルスは、複製欠損性である。複製欠損アデノウイルスは、感染性粒子を形成するために、ヘルパーウイルスおよび／またはパッケージング細胞株の助けを必要とする。得られたウイルスは、細胞に感染する能力があり、そしてプロモーターに作動可能に連結された目的のポリヌクレオチドを発現し得るが、ほとんどの細胞にて複製し得ない。複製欠損アデノウイルスは、次の遺伝子のすべてまたは一部のうちの1つ以上にて欠失され得る：E1a、E1b、E3、E4、E2aまたはL1～L5。

【0390】

特定の他の実施形態において、アデノ随伴ウイルス(AAV)を使用して、エキソビボまたはインビボでこの細胞を操作する。AAVは、感染性粒子を生成するためにヘルパーウイルスを必要とする、天然に存在する欠損ウイルスである(Muzyczka, N., Curr. Topics in Microbiol. Immunol. 158:97 (1992))。AAVはまた、非分裂細胞の中にそのDNAを組み込み得る数少ないウイルスの中の1つである。300塩基対程度の小さいAAVを含むベクターがパッケージされ得、そして組み込み得るが、外来性DNAのためのスペースは約4.5kbに限られる。そのようなAAVの生成および使用の方法は当該分野で公知である。例えば、米国特許第5,139,941号、同第5,173,414号、同第5,354,678号、同第5,436,146号、同第5,474,935号、同第5,478,745号および同第5,589,377号を参照のこと。

【0391】

例えば、本発明において使用するために適切なAAVベクターは、DNA複製、キャプシド形成、および宿主細胞組み込みに必要な配列すべてを含む。Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory

y Manual, Cold Spring Harbor Press (1989) において見いだされる方法のような、標準的クローニング方法を使用して、ポリヌクレオチド構築物を、このAAVベクターに挿入する。次いで、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿などを含む、任意の標準的技術を使用して、この組換えAAVベクターを、ヘルパーウイルスに感染しているパッケージング細胞にトランスフェクトする。適切なヘルパーウイルスとしては、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、ワクシニアウイルス、またはヘルペスウイルスが挙げられる。一旦パッケージング細胞がトランスフェクトおよび感染されると、それらはそのポリヌクレオチド構築物を含む感染性AAVウイルス粒子を生成する。次いで、エキソビボまたはインビボのいずれかで、これらのウイルス粒子を使用して真核生物細胞を形質導入する。この形質導入細胞は、そのゲノムに組み込まれたポリヌクレオチド構築物を含み、そして本発明のポリペプチドを発現する。

【 0 3 9 2 】

遺伝子治療の別の方法は、相同組換え（例えば、米国特許第5,641,670号、1997年6月24日発行；国際公開第WO96/29411号、1996年9月26日公開；国際公開第WO94/12650号、1994年8月4日公開；Kollerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932~8935 (1989)；およびZijlstraら、Nature 342:435~438 (1989)を参照のこと）を介して、異種制御領域および内在性ポリヌクレオチド配列（例えば、本発明のポリペプチドをコードしている配列）を作動可能に連結する工程を含む。この方法は、標的細胞中に存在しているが、通常はその細胞中で発現しないかまたは所望するよりも低いレベルで発現する、遺伝子の活性化を含む。

【 0 3 9 3 】

当該分野で既知の標準的技術を使用して、ポリヌクレオチド構築物を作製する。この構築物は、プロモーターを、そのプロモーターに隣接した標的化配列とともに含む。適切なプロモーターが、本明細書中に記載されている。標的化配列は、プロモーター-標的化配列と内在性配列との相同組換えを可能にするに十分に

その内在性配列に対して相補的である。標的化配列は、所望される内在性ポリヌクレオチド配列の5'末端の十分近くに存在し、それゆえ、相同組換えに際して、そのプロモーターは、その内在性配列に作動可能に連結される。

【 0 3 9 4 】

このプロモーターおよび標的化配列は、PCRを使用して増幅され得る。好ましくは、この増幅されたプロモーターは、5'末端および3'末端に別の制限酵素部位を含む。好ましくは、第1の標的化配列の3'末端は、増幅されたプロモーターの5'末端と同じ制限酵素部位を含み、そして第2の標的化配列の5'末端は、増幅されたプロモーターの3'末端と同じ制限部位を含む。増幅されたプロモーターおよび標的化配列を消化し、そしてともに連結する。

【 0 3 9 5 】

裸のポリヌクレオチドとしてか、もしくは上記により詳細に記載されるようなリボソーム、ウイルス配列、ウイルス粒子、ウイルス全体、リポフェクション、沈殿剤などのようなトランスフェクション促進剤と一緒にかのいずれかで、このプロモーター-標的化配列構築物を細胞に送達する。直接針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、粒子加速器などを含む任意の方法により、Pプロモーター-標的化配列を送達し得る。この方法を、下記により詳細に記載する。

【 0 3 9 6 】

プロモーター-標的化配列構築物は、細胞により取り込まれる。この構築物と内在性配列との間に相同組換えが起こり、その結果、内在性配列は、このプロモーターの制御下に配置される。次いで、このプロモーターは、内在性配列の発現を駆動する。

【 0 3 9 7 】

好ましくは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、そのタンパク質の分泌を促進する分泌シグナル配列を含む。代表的に、このシグナル配列は、コード領域の5'末端に向かってかまたは5'末端で発現される、そのポリヌクレオチドのコード領域に位置する。このシグナル配列は、目的のポリヌクレオチドに対して同種であってもよいしまたは異種であってもよく、そしてトランスフェクトされる細胞に対して同種であってもよいしまたは異種であってもよ

い。さらに、当該分野で公知の方法を使用して、このシグナル配列は化学合成され得る。

【 0 3 9 8 】

その投与形態によって、治療効果を提供するのに十分な量にて1つ以上の分子が発現される限り、上記のポリヌクレオチド構築物のうちのいずれかの任意の投与形態が使用され得る。これは、直接針注射、全身性注射、カテーテル注入、バイオリスティック (b i o l i s t i c) 注射器、粒子加速器 (すなわち、「遺伝子銃」)、ゲルフォームスポンジデポ (d e p o t)、他の市販デポ (d e p o t) 物質、浸透圧ポンプ (例えば、A l z a ミニポンプ)、経口用または坐剤用の固形 (錠剤または丸剤) 薬学的処方物、および手術中のデカンティング (d e c a n t i n g) または局所適用を含む。例えば、ラット肝臓およびラット脾臓へのリン酸カルシウム沈澱した裸のプラスミドの直接注射、または門脈へのタンパク質被覆プラスミドの直接注射は、ラット肝臓における外来遺伝子の遺伝子発現をもたらした (K a n e d a ら、S c i e n c e、2 4 3 : 3 7 5 (1 9 8 9))。

【 0 3 9 9 】

局所投与の好ましい方法は、直接注射によるものである。好ましくは、送達ビヒクルと複合体を形成した本発明の組換え分子は、動脈領域内部に直接注射により投与されるか、または動脈領域内部に局所投与される。動脈領域内部での組成物の局所投与とは、その組成物を動脈内に数センチメートル、好ましくは数ミリメートルで注射することを言う。

【 0 4 0 0 】

局所投与の別の方法は、本発明のポリヌクレオチド構築物を外科的創傷中または外科的創傷の周囲に接触させることである。例えば、患者は手術を経験し得、そしてこのポリヌクレオチド構築物はその創傷の内側の組織の表面上にコーティングされ得るか、またはこの構築物が、その創傷の内側の組織の領域に注入され得る。

【 0 4 0 1 】

全身投与に有用な治療組成物は、本発明の標的化された送達ビヒクルと複合体

を形成した本発明の組換え分子を含む。全身投与で使用するために適切な送達ビヒクルは、特定部位に対してそのビヒクルを標的化するリガンドを含むリボソームを含む。

【 0 4 0 2 】

全身投与の好ましい方法としては、静脈内注射、エアロゾル、経口および経皮（局所的）送達が挙げられる。当該分野で標準的な方法を使用して、静脈内注射が実行され得る。当該分野で標準的な方法を使用して、エアロゾル送達もまた実行され得る（例えば、本明細書中で参考として援用される、S t r i b l i n g ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 189:11277~11281（1992）を参照のこと）。動物の腸内の消化酵素による分解に耐える能力をもつキャリアに対して本発明のポリヌクレオチド構築物を複合体形成することにより、経口送達は実行され得る。そのようなキャリアの例としては、当該分野で公知であるもののような、プラスチックカプセルまたは錠剤が挙げられる。皮膚内へ通過可能な親油性試薬（例えば、D M S O）と本発明のポリヌクレオチド構築物を混合することによって、局所的送達は実行され得る。

【 0 4 0 3 】

送達される物質の有効量を決定することは、例えば、その物質の化学構造および生物学的活性、動物の年齢および体重、処置を必要とする正確な状態およびその重症度、ならびに投与経路を含む、多数の因子に依存し得る。処置の頻度は、1用量あたりの投与されるポリヌクレオチド構築物の量ならびに被験体の健康および病歴のような、多くの因子に依存する。正確な量、投薬回数および投薬のタイミングは、主治医または主治獣医により決定される。

【 0 4 0 4 】

本発明の治療的組成物は、任意の動物に、好ましくは哺乳動物および鳥類に投与され得る。好ましい哺乳動物としては、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ウマおよびブタが挙げられ、特にヒトが好ましい。

【 0 4 0 5 】

（生物学的活性）

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはアゴニストもしくはア

ンタゴニストをアッセイに使用し、1つ以上の生物学的活性について試験し得る。本発明のこれらのポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはアゴニストもしくはアンタゴニストが、特定のアッセイにおいて活性を示す場合、これらの分子はその生物学的活性に関連した疾患に関与し得るようである。従って、このポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよびアゴニストもしくはアンタゴニストは、関連した疾患を処置するために使用され得る。

【 0 4 0 6 】

P T P a s eタンパク質は、細胞シグナル伝達、軸索成長、細胞接着、および組織治癒に関連する生物学的活性に関与すると考えられている。従って、本発明の組成物（本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体、ならびにそれらのフラグメントおよび改変体を含む）は、異常なP T P a s e活性に関連する疾患および／または障害の診断、予後、予防、および／または処置に使用され得る。

【 0 4 0 7 】

好ましい実施形態において、本発明の組成物（本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体、ならびにそれらのフラグメントおよび改変体を含む）は、組織治癒障害（例えば、および／または本明細書中の「創傷治癒および上皮細胞増殖」の節に記載されるようなもの）、軸索成長（本明細書中の「神経活性および神経学的疾患」の節に記載されるようなもの）、細胞接着障害、および異常な細胞シグナル伝達に関係する疾患および／または障害の診断、予後、予防および／または処置において使用され得る。

【 0 4 0 8 】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、あるいはそのポリペプチドに対応するポリヌクレオチド、抗体、アゴニストまたはアンタゴニストは、本発明のポリペプチドが発現される組織に関連する疾患および／または障害を診断および／または予防するために使用され得、この組織には、「本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド」に開示される組織、および／または表3、第2列（ライブラリーコード）に開示される1、2、3、4、5またはそれ以上の組織が挙げられる。

【 0 4 0 9 】

従って、本発明のポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体は、活性に関連した疾患および／または障害（H I V誘導痴呆、不整脈、高血圧、筋収縮性機能不全、ペースメーカー機能不全、適切な神経伝達物質放出の障害、癲癇、発作および／またはホルモン分泌障害）の診断、検出および／または処置に有用である。

【 0 4 1 0 】

より一般に、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体は、以下の系に関連する疾患および／または障害の診断、検出および／または処置に有用であり得る。

【 0 4 1 1 】

（免疫活性）

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、例えば、免疫細胞の増殖、分化もしくは動員（走化性）を活性化または阻害することによる、免疫系の疾患、障害および／または状態を処置、予防および／または診断において有用であり得る。免疫細胞は、造血と呼ばれるプロセスを介して発生し、多能性幹細胞から骨髄性細胞（血小板、赤血球、好中球およびマクロファージ）およびリンパ系細胞（Bリンパ球およびTリンパ球）を生成する。これらの免疫疾患、障害および／または状態の病因は、遺伝的、身体的（s o m a t i c）（例えば、癌およびいくつかの自己免疫性障害）、後天的（例えば、化学療法もしくは毒素による）または感染的であり得る。さらに、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、特定の免疫系の疾患または障害のマーカーまたは検出物質（d e t e c t o r）として使用され得る。

【 0 4 1 2 】

別の実施形態において、本発明のポリペプチド、あるいはそのポリペプチドに対応するポリヌクレオチド、抗体、アゴニストまたはアンタゴニストは、免疫系の疾患および障害を処置するためおよび／または本発明のポリペプチドが発現される組織（「本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド」の節に開示される組織を含む）に関連する細胞によって生じた免疫応答を阻害または増強するため

に使用され得る。

【 0 4 1 3 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫不全症（先天性または後天性の免疫不全症の両方を含む）の処置、予防および／または診断に有用であり得る。免疫グロブリンレベル、B細胞機能および／またはB細胞数が減少するB細胞免疫不全症の例としては、以下が挙げられる：X連鎖無ガンマグロブリン血症（ブルートン病）、X連鎖小児性無ガンマグロブリン血症、過剰IgMを伴うX連鎖免疫不全症、過剰IgMを伴う非X連鎖免疫不全症、X連鎖リンパ球増殖症候群（XLP）、無ガンマグロブリン血症（先天性および後天性無ガンマグロブリン血症を含む）、成体発症無ガンマグロブリン血症、後期発症無ガンマグロブリン血症、異常ガンマグロブリン血症、低ガンマグロブリン血症、不特定（unspecified）低ガンマグロブリン血症、劣性無ガンマグロブリン血症（スイス型）、選択的IgM欠損症、選択的IgA欠損症、選択的IgGサブクラス欠損症、IgGサブクラス欠損症（IgA欠損症を伴うかまたは伴わない）、Ig欠損症（IgMの増加を伴う）、IgGおよびIgA欠損症（IgMの増加を伴う）、正常なIgまたはIgの上昇を伴う抗体欠損症、Ig重鎖欠乏、κ鎖欠損症、B細胞リンパ球増殖障害（BLPD）、分類不能型免疫不全（CVID）、分類不能型免疫不全（CVI）（後天性）、および一過性乳児低ガンマグロブリン血症。

【 0 4 1 4 】

特定の実施形態において、毛細血管拡張性運動失調または毛細血管拡張性運動失調に関連する状態が、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、および／またはそのアゴニストを使用して、緩和または処置される。

【 0 4 1 5 】

T細胞および／またはB細胞の機能および／または数が減少される先天性の免疫不全症の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ディ・ジョージ異常、重症複合型免疫不全（SCID）（X連鎖SCID、常染色体劣性SCID、アデノシンデアミナーゼ欠損症、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）欠損症、クラスII MHC欠損症（不全リンパ球症候群）、ウィス

コッターオールドリッチ症候群、および毛細血管拡張性運動失調を含むが、これらに限定されない)、胸腺発育不全、3次および4次咽頭嚢症候群、22q11.2欠損、慢性粘膜皮膚カンジダ症、ナチュラルキラー細胞欠損症(NK)、特発性CD4+Tリンパ球減少症、優性T細胞欠損(不特定)を伴う免疫不全症、および細胞媒介免疫の不特定免疫不全症。

【0416】

特定の実施形態において、ディ・ジョージ異常またはディ・ジョージ異常に関連する状態が、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、またはそのアンタゴニストもしくはアゴニストを使用して、緩和または処置される。

【0417】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドおよび/またはそのアゴニストを投与することによって緩和または処置され得る、他の免疫不全症としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:慢性肉芽腫症、チェディアック-東病、ミエロペルオキシダーゼ欠損症、白血球グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠損症、X連鎖リンパ球増殖症候群(XLP)、白血球接着欠損症、補体成分欠損症(C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8および/またはC9欠損症を含む)、網様発育不全、胸腺リンパ形成不全、胸腺腫を伴う免疫不全、重篤な先天性白血球減少症、免疫不全症を伴う形成異常、新生児好中球減少症、短肢小人症、およびIgによる免疫不全症を共存するネゼロフ症候群。

【0418】

好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および/またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫不全個体間で免疫応答性をブーストするための薬剤として使用され得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および/またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、B細胞および/またはT細胞免疫不全個体間で免疫応答性をブーストするための薬剤として使用され得る。

【0419】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および/またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、自己免疫障害の処置、予防および/または診断におい

て有用であり得る。多くの自己免疫障害は、免疫細胞によって自己物質を外来物質として不適切に認識されることによって生じる。この不適切な認識は、宿主組織の破壊を誘導する免疫応答を生じる。従って、免疫応答（特に、T細胞の増殖、分化または走化性）を阻害し得る本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの投与は、自己免疫障害の予防における効果的な治療であり得る。

【 0 4 2 0 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置、予防および／または診断され得る自己免疫疾患または障害としては、以下の1以上が挙げられるが、これらに限定されない：全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、強直性脊椎炎、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、橋本甲状腺病、自己免疫溶血性貧血、溶血性貧血、血小板減少症、自己免疫血小板減少症紫斑病、自己免疫新生児血小板減少症、特発性血小板減少症紫斑病、紫斑病（例えば、ヘーノホーシェーンライン紫斑病）、自己免疫性血球減少症、グッドパスチャー症候群、尋常性天疱瘡、重症筋無力症、グレーブス病（甲状腺機能亢進症）、およびインスリン耐性糖尿病。

【 0 4 2 1 】

本発明の組成物で処置、予防および／または診断され得る自己免疫成分を有するであろうさらなる障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：I型コラーゲン誘導性関節炎、抗リン脂質症候群、皮膚炎、アレルギー性脳脊髄炎、心筋炎、再発性多発性軟骨炎、リウマチ性心疾患、神経炎、ブドウ膜炎、多発性内分泌腺症、ライター病、スティッフマン症候群、自己免疫肺炎、自閉症、ギャンーバレー症候群、インスリン依存性糖尿病、および自己免疫炎症性眼障害。

【 0 4 2 2 】

本発明の組成物で処置、予防および／または診断され得る自己免疫成分を有するであろうさらなる障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗コラーゲン抗体を伴う強皮症（例えば、核小体および他の核抗体によってしばしば特徴付けられる）、混合結合組織病（例えば、抽出可能核抗原（例えば、リボ核タンパク質）に対する抗体によってしばしば特徴付けられる）、多発性筋

炎（例えば、非ヒストンANAによってしばしば特徴付けられる）、悪性貧血（例えば、抗壁細胞、ミクロソーム、および内因子抗体によってしばしば特徴付けられる）、特発性アジソン病（例えば、体液性および細胞媒介性の副腎細胞傷害性によってしばしば特徴付けられる）、不妊症（例えば、抗精子抗体によってしばしば特徴付けられる）、糸球体腎炎（例えば、糸球体基底膜抗体または免疫複合体によってしばしば特徴付けられる）、水疱性類天疱瘡（例えば、基底膜におけるIgGおよび補体によってしばしば特徴付けられる）、シューグレン症候群（例えば、多組織抗体および／または特定の非ヒストンANA（SS-B）によってしばしば特徴付けられる）、糖尿病（例えば、細胞媒介性および体液性島細胞抗体によってしばしば特徴付けられる）、およびアドレナリン作用性薬物耐性（ぜん息または嚢胞性線維症を伴うアドレナリン作用性薬物耐性を含む）（例えば、 β -アドレナリン作用性レセプター抗体によってしばしば特徴付けられる）。

【0423】

本発明の組成物で処置、予防、および／または診断され得る自己免疫成分を有するさらなる障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：慢性活動性肝炎（例えば、平滑筋抗体によってしばしば特徴付けられる）、原発性胆汁性肝硬変（例えば、ミトコンドリア抗体によってしばしば特徴付けられる）、他の内分泌腺不全（例えば、いくつかの場合における特異的組織抗体によってしばしば特徴付けられる）、白斑（例えば、メラノサイト抗体によってしばしば特徴付けられる）、脈管炎（例えば、血管壁におけるIgおよび補体ならびに／または低い血清補体によってしばしば特徴付けられる）、MI後（例えば、心筋抗体によってしばしば特徴付けられる）、心臓切開症候群（例えば、心筋抗体によってしばしば特徴付けられる）、じんま疹（例えば、IgEに対するIgGおよびIgM抗体によってしばしば特徴付けられる）、アトピー性皮膚炎（IgEに対するIgGおよびIgM抗体によってしばしば特徴付けられる）、ぜん息（例えば、IgEに対するIgGおよびIgM抗体によってしばしば特徴付けられる）、ならびに多くの他の炎症性、肉芽腫性、変性および萎縮性障害。

【0424】

好ましい実施形態において、これらの自己免疫疾患および障害ならびに／または上記のこれらの疾患および障害に関連する障害および／または状態は、例えば、本発明のアンタゴニストまたはアゴニスト、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを使用して、処置、予防および／または診断される。特定の好ましい実施形態において、慢性関節リウマチは、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、処置、予防および／または診断される。別の特定の実施形態において、全身性エリテマトーデスが、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置、予防、診断および／または予測される。別の特定の好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、特発性血小板減少性紫斑病が処置、予防、診断および／または予測される。別の特定の好ましい実施形態において、IgAネフロパシーは、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、処置、予防および／または診断される。

【 0 4 2 5 】

好ましい実施形態において、自己免疫疾患および自己免疫障害ならびに／または上記の疾患および障害と関連する状態は、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、処置、予防および／または診断される。

【 0 4 2 6 】

好ましい実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫抑制剤として使用される。

【 0 4 2 7 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、造血細胞の疾患、障害および／または状態の処置、予防および／または診断において有用であり得る。本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、白

血病、好中球減少症、貧血、および血小板病床が挙げられるが、それらに限定されない、特定の（または多くの）型の造血細胞の減少に関連した疾患、障害および／または状態を処置または予防する試みにおいて、多能性幹細胞を含む造血細胞の分化および増殖を増加させるために用いられ得る。あるいは、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、組織球増殖症が挙げられるが、それらに限定されない、特定の（または多くの）型の造血細胞の減少に関連した疾患、障害および／または状態を処置または予防する試みにおいて、多能性幹細胞を含む造血細胞の分化および増殖を増加させるために用いられ得る。

【 0 4 2 8 】

アレルギー反応および状態（例えば、喘息（特にアレルギー性喘息）または他の呼吸障害）はまた、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、処置、予防および／または診断され得る。さらに、これらの分子は、アナフィラキシー、抗原性分子に対する過敏性、または血液型不適合を処置、予防および／または診断するために用いられ得る。

【 0 4 2 9 】

さらに、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、および／またはそのアゴニストは、I g E 媒介アレルギー応答を処置または予防するために使用され得る。このようなアレルギー反応としては、喘息、鼻炎および湿疹が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、インビトロまたはインビボにおいて I g E 濃度の調節に有用である。

【 0 4 3 0 】

さらに、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、炎症状態の診断、予測、予防および／または処置に使用される。例えば、本発明のポリペプチド、抗体、もしくはポリヌクレオチド、および／または本発明のアゴニストもしくはアンタゴニストは、炎症応答に関与する細胞の活性化、増殖および／または分化を阻害し得る。これらの分

子を使用して、慢性および急性の両方の状態の炎症状態を、診断、予測、予防および／または処置し得る。このような炎症状態は以下を含むがこれらに限定されない。例えば、感染に関連する炎症（例えば、敗血症性ショック、敗血症、または全身炎症応答症候群）、虚血再灌流傷害に関連する炎症、内毒素致死に関連する炎症、関節炎に関連する炎症、補体媒介性超急性拒絶に関連する炎症、腎炎に関連する炎症、サイトカインまたはケモカインが誘導する肺傷害に関連する炎症、炎症性腸疾患に関連する炎症、クローン病に関連する炎症またはサイトカイン（例えば、TNFまたはIL-1）の過剰生成から生じる炎症、呼吸器障害（例えば、喘息およびアレルギー）；胃腸障害（例えば、炎症性腸疾患）；癌（例えば、胃癌、卵巣癌、肺癌、膀胱癌、肝臓癌、および乳癌）；CNS障害（例えば、多発性硬化症、血液脳関門透過性、虚血性脳損傷、および／または脳梗塞、外傷性脳損傷、神経変性性障害（例えば、パーキンソン病およびアルツハイマー病）、AIDS関連痴呆、およびプリオン病）；心血管障害（例えば、アテローム性動脈硬化症、心筋炎、心血管疾患、および心肺バイパス合併症）；ならびに炎症によって特徴付けられる多くのさらなる疾患、状態、および障害（例えば、慢性肝炎（BおよびC）、慢性関節リウマチ、痛風、外傷、敗血症性ショック、睪炎、サルコイドーシス、皮膚炎、腎虚血再還流障害、グレーヴス病、全身性エリテマトーデス、真性糖尿病（例えば、I型糖尿病）、および同種異系移植拒絶）。

【 0 4 3 1 】

炎症は、基礎的な防御機構なので、炎症障害は、実質的に体の任意の組織に影響を与え得る。従って、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体およびそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、以下を挙げられるがこれらに限定されない、組織特異的炎症障害の処置に使用される。副腎炎、肺胞炎、胆管炎、虫垂炎、龟头炎、眼瞼炎、気管支炎、滑液胞炎、心臓炎、蜂巣炎、子宮管炎、胆嚢炎、声帯炎、蝸牛炎、大腸炎、結膜炎、膀胱炎、皮膚炎、憩室炎、脳炎、心内膜炎、食道炎、耳管炎、結合組織炎、毛胞炎、胃炎、胃腸炎、歯肉炎、舌炎、肝脾炎、角膜炎、迷路炎、喉頭炎、リンパ管炎、乳腺炎、縦隔炎、髄膜炎、子宮炎、粘膜炎、心筋炎、筋炎、鼓膜炎、腎炎、神経炎、精巣炎、骨髓炎、耳炎、脈管周囲炎、腱周囲炎、腹膜炎、喉頭炎、静脈炎、灰白髄炎、前立腺炎、歯髄炎、網膜

炎、鼻炎、卵管炎、強膜炎、強膜脈絡膜炎、陰囊炎、静脈洞炎、脊椎炎、脂肪組織炎、口内炎、滑膜炎、耳管炎、腱炎、扁桃炎、尿道炎、および膣炎。

【 0 4 3 2 】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、もしくはポリヌクレオチド、および／またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストは、移植拒絶、対宿主性移植片病の処置、診断および／または予防に有用である。器官拒絶は、免疫応答を通じた移植された組織の宿主免疫細胞破壊によって起こる。同様に、免疫反応はまた、GVHDに関するが、この場合、外来の移植された免疫細胞が、宿主組織を破壊する。本発明のポリペプチド、抗体、もしくはポリヌクレオチドおよび／またはそのアゴニストもしくはアンタゴニスト（免疫応答、特にT細胞の活性化、増殖、分化、または走化性を阻害する）は、器官拒絶またはGVHDを予防するのに有効な治療であり得る。特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、もしくはポリヌクレオチドおよび／またはそのアゴニストもしくはアンタゴニスト（免疫応答、特にT細胞の活性化、増殖、分化、または走化性を阻害する）は、実験的アレルギー拒絶および超急性異種移植拒絶を予防するのに有効な治療であり得る。

【 0 4 3 3 】

他の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、もしくはポリヌクレオチド、および／またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストは、以下に挙げられるが、それらに限定されない、免疫複合疾患の処置、診断および／または予防に有用であり得る。血清病、後連鎖球菌性糸球体腎炎（*post streptococcal glomerulonephritis*）、多発性動脈炎、および免疫複合誘導性脈管炎。

【 0 4 3 4 】

本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストは、感染性因子の処置、検出および／または予防に有用であり得る。例えば、免疫応答を増大することによって、特にB細胞および／またはT細胞の増殖、活性化および／または分化を増大することによって、感染性疾患は、処置、検出、および／または予防され得る。免疫応答は、既存

の免疫応答を増大するか、または新しい免疫応答を惹起するかのいずれかによって、増大され得る。あるいは、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、免疫応答の必然的な惹起なしに、感染性因子（感染性因子の適用列挙の節などで述べる）を直接阻害し得る。

【 0 4 3 5 】

別の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、特定の抗原に対する免疫応答を増大するアジュバントとして使用される。特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、腫瘍特異的な免疫応答を増大するアジュバントとして使用される。

【 0 4 3 6 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、抗ウイルス免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。アジュバントとして本発明の組成物を用いて増強され得る抗ウイルス免疫応答としては、ウイルスおよび本明細書において記載されるかさもなければ当該分野で公知のウイルス関連疾患および症状が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、以下：AIDS、髄膜炎、デング、EBV、および肝炎（例えば、B型肝炎）からなる群より選択される、ウイルス、疾患または症状に対する免疫応答を増強するためのアジュバントとして用いられる。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、以下：AIDS、髄膜炎、デング、EBV、および肝炎（例えば、B型肝炎）からなる群より選択される、ウイルス、疾患または症状に対する免疫応答を増強するためのアジュバントとして用いられる。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、以下：HIV/AIDS、RSウイルス、デング、ロタウイルス、日本脳炎、インフルエンザAおよびB、パラインフルエンザ、麻疹、サイトメガロウイルス、狂犬病、Juninウイルス、チクングニヤウイルス、リフトバレー熱、単純疱疹、および黄熱病からなる群より選択されるウイルス、疾患また

は症状に対する免疫応答を増強するアジュバントとして用いられる。

【 0 4 3 7 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、抗細菌免疫応答または抗真菌免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。アジュバントとして本発明の組成物を使用して増大され得る抗細菌免疫応答または抗真菌免疫応答としては、細菌または真菌、および本明細書中に記載されるか、または、さもなくば当該分野で公知の疾患または症状に関連する細菌または真菌が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、細菌または真菌、疾患、または症状（これは、破傷風、ジフテリア、ボツリスム、およびB型髄膜炎からなる群から選択される）に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。

【 0 4 3 8 】

別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、細菌または真菌、疾患、または症状（これは、*Vibrio cholerae*、*Mycobacterium leprae*、*Salmonella typhi*、*Salmonella paratyphi*、*Meisseria meningitidis*、*Streptococcus pneumoniae*、Group B *Streptococcus*、*Shigella* spp.、Enterotoxigenic *Escherichia coli*、Enterohemorrhagic *E. coli*、*Borrelia burgdorferi*、および*Plasmodium*（マラリア）からなる群から選択される）に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。

【 0 4 3 9 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、抗寄生生物免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。アジュバントとして本発明の組成物を使用して増大され得る抗寄生生物免疫応答としては、寄生生物、および本明細書中に記載されるかまたはさもなくば、当該分野で公知の疾患または症状

に関連する寄生生物が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、寄生生物に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、*Plasmodium* (マラリア) または *Leishmania* に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。

【 0 4 4 0 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、例えば、単核性食細胞の漸増および活性化を予防することによって、珪胚症、サイコイドーシス、および特発性肺線維症を含む感染疾患の処置に使用され得る。

【 0 4 4 1 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、本発明のポリペプチドに対する免疫介在応答を阻害する、または増大する抗体の産生のための抗体として使用される。

【 0 4 4 2 】

1つの実施形態として、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫系をブーストし、1つ以上の抗体（例えば、IgG、IgA、IgM、およびIgE）の量の増大を生じ、高い親和性の抗体産生および免疫グロブリンクラス転換（例えば、IgG、IgA、IgMおよびIgE）を誘導し、および／または免疫応答を増大するための動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、ミニブタ、ニワトリ、ラクダ、ヤギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類、およびヒト、最も好ましくはヒト）に投与される。

【 0 4 4 3 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、病原体に対するB細胞応答性の刺激物質として使用される。

【 0 4 4 4 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、T細胞のアクチベーターとして使用される。

【 0 4 4 5 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫抑制性治療を受ける前の、個体の免疫状態を増大させる薬剤として使用される。

【 0 4 4 6 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、より高い親和性抗体を誘導するための薬剤として使用される。

【 0 4 4 7 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、血清免疫グロブリン濃度を増加するための薬剤として使用される。

【 0 4 4 8 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫無防備状態の個体の回復を促進するための薬剤として使用される。

【 0 4 4 9 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、高齢の集団の間の免疫応答性をブーストするための薬剤として使用される。

【 0 4 5 0 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、骨髄移植および／または他の移植（例えば、同種異系または外因性の器官移植）の前、間、または後の免疫系エンハンサーとして使用される。移植に関して、本発明の組成物は、移植の前、同時、および／または後に投与され得る。特定の実施形態において、本

発明の組成物は、移植の後、T細胞集団の回復の開始前に投与される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、移植の後、T細胞集団の回復の開始後であるが、B細胞集団の完全な回復の前に最初に投与される。

【 0 4 5 1 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、B細胞機能の後天的欠損を有する個体間で免疫応答性をブーストするための薬剤として使用される。ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび／またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与することによって寛解または処置され得る、B細胞機能の後天的欠損を生じる状態としては、HIV感染、AIDS、骨髄移植、およびB細胞慢性リンパ球性白血病（CLL）が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 4 5 2 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、一時的な免疫不全を有する個体間で免疫応答性をブーストするための薬剤として使用される。ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび／またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与することによって寛解または処置され得る、一時的な免疫不全を生じる状態としては、ウイルス感染（例えば、インフルエンザ）からの回復、栄養失調に関連する状態、感染性単核細胞症からの回復、またはストレスに関連する状態、麻疹からの回復、輸血からの回復、手術からの回復が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 4 5 3 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、単球、樹状細胞および／またはB細胞による抗原提示のレギュレーターとして使用される。1つの実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、インビトロまたはインビボで抗原提示を増強するかまたは抗原提示をアンタゴナイズする。さらに、関連する実施形

態において、この抗原提示の増強またはアンタゴナイズは、抗腫瘍処置としてかまたは免疫系を調節するために有用であり得る。

【 0 4 5 4 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、個体の免疫系を、T H 1細胞性応答とは反対に、体液性応答（すなわち、T H 2）の発生に指向するための薬剤として使用される。

【 0 4 5 5 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、腫瘍増殖を誘導し、従って、腫瘍を抗腫瘍性薬剤に対してより感受性にするための手段として使用される。例えば、多発性骨髄腫は、緩慢な細胞分裂（d i v i d i n g）の疾患であり、従って、実質的に全ての抗腫瘍性レジメンに対して不応性である。これらの細胞は、より迅速に増殖させた場合、これらの感受性プロフィールは、おそらく変化するであろう。

【 0 4 5 6 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、A I D S、慢性リンパ球障害および／または分類不能性免疫不全症（C o m m o n V a r i a b l e I m m u n o d i f i c i e n c y）のような病理におけるB細胞の産生の刺激因子として使用される。

【 0 4 5 7 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、手術、外傷または遺伝的欠陥後のリンパ組織の生成および／または再生のための治療として使用される。別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、移植前の骨髄サンプルの前処理として使用される。

【 0 4 5 8 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、SCID患者の間で観察されるような免疫不全症／免疫欠損を生じる遺伝性の障害のための遺伝子ベースの治療として使用される。

【 0 4 5 9 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、単球に影響を及ぼす寄生生物疾患（リーシュマニア属（*Leishmania*））に対して防御するために単球／マクロファージを活性化する方法として使用される。

【 0 4 6 0 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、本発明のポリペプチドによって誘発される分泌サイトカインを調節する方法として使用される。

【 0 4 6 1 】

上記の用途の全ては、これらとして、獣医学に適用される。

【 0 4 6 2 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、外来因子または自己に対する種々の局面の免疫応答をブロックする方法として使用される。例としては、狼瘡および関節炎のような自己免疫障害、ならびに皮膚アレルギー、炎症、腸疾患、損傷に対する免疫応答性および病原体に関する疾患／障害が挙げられる。

【 0 4 6 3 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、自己免疫疾患（例えば、特発性血小板減少性紫斑病、全身性エリテマトーデスおよびMS）に関連するB細胞増殖およびIg分泌を妨げるための治療として使用される。

【 0 4 6 4 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、自己免疫疾患（例えば、特発性血小板減少性紫斑病、全身性エリテマトーデスおよびMS）に関連するB細胞増殖およびIg分泌を妨げるための治療として使用される。

ド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、内皮細胞におけるB細胞および／またはT細胞の遊走のインヒビターとして使用される。この活性は、組織構造または同属の応答を破壊し、そして例えば、免疫応答の破壊および敗血症のブロックにおいて有用である。

【 0 4 6 5 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、未定量有意性の単一クローン性高ガンマグロブリン血症 (monoclonal gammopathy of undetermined significance) (MGUS)、ヴァルデンストレーム疾患、関連する特発性単一クローン性高ガンマグロブリン血症、およびプラズマ細胞腫のような疾患において明らかな、慢性の高ガンマグロブリン血症のための治療として使用される。

【 0 4 6 6 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、例えば、特定の自己免疫疾患および慢性炎症疾患および感染性疾患における、マクロファージおよびその前駆体、ならびに好中球、好塩基球、Bリンパ球およびいくつかのT細胞サブセット（例えば、活性化T細胞およびCD8細胞傷害性T細胞ならびにナチュラルキラー細胞）の、ポリペプチド走化性および活性化を阻害するために使用され得る。自己免疫疾患の例は、本明細書中に記載され、その自己免疫疾患の例としては、多発性硬化症およびインスリン依存性糖尿病が挙げられる。

【 0 4 6 7 】

本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、例えば、好酸球の産生および遊走を妨げることによって、特発性好酸球増多症候群を処置するために使用され得る。

【 0 4 6 8 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、相補的介在細胞溶解を増大する、または阻害するために使用される。

【 0 4 6 9 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、抗体依存性細胞性細胞毒性 (c y t o x i c i t y) を増大するか、または阻害するために使用される。

【 0 4 7 0 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、例えば、動脈壁における単球浸潤を妨げることによって、アテローム性動脈硬化症を処置するために使用され得る。

【 0 4 7 1 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、成人呼吸促進症候群 (A R D S) を処置するために使用され得る。

【 0 4 7 2 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、創傷および組織の修復の刺激、新脈管形成の刺激、血管またはリンパの疾患または障害の修復の刺激において有用であり得る。さらに、本発明のアゴニストおよびアンタゴニストは、粘膜表面の再生を刺激するために使用され得る。

【 0 4 7 3 】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および／またはそれらのアゴニストは、原発性または後天性の免疫不全、欠損性の血清免疫グロブリン産生、再発性の感染および／または免疫系機能不全によって特徴付けられる障害を処置または予防するために使用される。さらに、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および／またはそれらのアゴニストは、関節、骨、皮膚および／または耳下腺の感染、血液由来の感染（例えば、敗血症、髄膜炎、敗血症性関節炎および／または骨髓炎）、自己免疫疾患（例えば、本明細書中に開示されるような自己免疫疾患）、炎症性障害、および悪性疾患、ならびに／ある

いはこれらの感染、疾患および／または悪性疾患に関連する任意の疾患または障害または状態（CVID、他の原発性免疫不全、HIV疾患、CLL、再発性気管支炎、静脈洞炎、中耳炎、結膜炎、肺炎、肝炎、髄膜炎、帯状ヘルペス（例えば、重篤な帯状ヘルペス）および／またはニューモシスティスを含むが、これらに限定されない）を処置または予防するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、および／またはアゴニストによって予防、診断または処置され得る他の疾患および傷害として、HIV感染、HTLV-BLV感染、リンパ球減少、食細胞殺細菌機能不全、血小板減少、およびヘモグロビン尿症が挙げられるが、それらに限定されない。

【 0 4 7 4 】

別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、分類不能性免疫不全症（Common Variable Immunodeficiency）（「CVID」；「後天性無ガンマグロブリン血症」および「後天性低ガンマグロブリン血症」としても公知である）またはこの疾患のサブセットを有する個体を、処置および／または診断するために使用される。

【 0 4 7 5 】

特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、自己免疫細胞あるいは、組織関連癌または新生物を含む癌または新生物の処置、診断および／または予防に使用され得る。本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストによって予防、診断または処置され得る癌または新生物の例は、本明細書中に記載され、そして以下が挙げられる：急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病、プラズマ細胞腫、多発性骨髄腫、バーキットリンパ腫、およびEBV変換性（EBV-transformed）疾患。好ましい実施形態において、本明細書中に記載されるような毒素または放射性同位体に結合体化した本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、癌および新生物を処置、診

断および／または予防するために使用され得る。さらに好ましい実施形態において、本明細書中に記載されるような、毒素または放射性同位体に結合体化した本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、急性骨髄性白血病を処置、診断および／または予防するために使用され得る。

【 0 4 7 6 】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、ラージB細胞リンパ腫の細胞増殖を減少するための治療として使用される。

【 0 4 7 7 】

別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、慢性骨髄性白血病に関連するB細胞およびIgの関与を減少する手段として使用される。

【 0 4 7 8 】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、B細胞免疫不全個体（例えば、部分的または完全な脾臓摘出術を受けた個体など）の間で免疫応答性をブーストするための因子として使用される。

【 0 4 7 9 】

本発明のアンタゴニストとしては、例えば、結合抗体および／または阻害抗体、アンチセンス核酸、リボザイムあるいは可溶性形態の本発明のポリペプチド（例えば、Fc融合タンパク質）（例えば、実施例9を参照のこと）が挙げられる。例えば、本発明のアゴニストとしては、結合抗体および／または阻害抗体、アンチセンス核酸、リボザイムあるいは可溶性形態のポリペプチド（例えば、Fc融合タンパク質）（例えば、実施例9を参照のこと）が挙げられる。本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、本明細書中に記載されるように、薬学的に受容可能なキャリアを用いた組成物として使用され得る。

【 0 4 8 0 】

別の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、お

よび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、機能的な内因性抗体分子を産生できないか、さもなければ易感染性の内因性免疫系を有するが、別の動物由来の再構成されたか、または部分的に再構成された免疫系的手段によってヒト免疫グロブリン分子を産生し得る、動物（上記に列挙した動物を含むがこれに限定されず、またトランスジェニック動物も含む）へ投与される（例えば、PCT公開番号、WO98/24893、WO96/34096、WO96/33735、およびWO91/10741を参照のこと）。さらに、このような動物への本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび／またはアゴニスト、もしくはアンタゴニストの投与は、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび／またはアゴニスト、もしくはアンタゴニストに対するモノクローナル抗体の産生に有用である。

【 0 4 8 1 】

さらに、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および／またはアンタゴニストは、アポトーシスに影響し得、したがって細胞生存の増大またはアポトーシスの阻害に関する多くの疾患を処置する際に有用である。例えば、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および／またはアンタゴニストによって処置または検出され得る細胞生存の増大またはアポトーシスの阻害に関する疾患としては、以下が挙げられる：癌（例えば、濾胞性リンパ腫、p53変異を伴う癌、およびホルモン依存性腫瘍（以下を含むが、これらに限定されない：結腸癌、心臓性腫瘍（cardiac tumors）、膵臓癌、黒色腫、網膜芽腫、神経膠芽腫、肺癌、腸癌、精巣癌、胃癌、神経芽腫、粘液腫、筋腫、リンパ腫、内皮腫、骨芽細胞腫、骨巨細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、腺腫、乳癌、前立腺癌、カポジ肉腫、および卵巣癌））；自己免疫障害（例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病（Behcet's disease）、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデス、ならびに免疫性糸球体腎炎（immune-related glomerulonephritis）および慢性関節リウマチ）ならびにウイルス感染（例えば、ヘルペスウイルス、ポックスウイルスおよびアデノウイルス）炎症、対宿主性移植片病、急性移植片拒絶、ならびに慢性移植片拒絶。好ましい実施形態において、

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および／またはアンタゴニストを用いて、癌（特に上に列挙したもの）の増殖、進行、および／または転移（*metastasis*）を阻害する。

【 0 4 8 2 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および／またはアンタゴニストによって処置または検出され得る、細胞の生存を増大させることに関するさらなる疾患または状態としては、以下の進行および／または転移が挙げられるが、これらに限定されない：悪性腫瘍および関連する障害（例えば、白血病（急性白血病（例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病（骨髄芽球性白血病、前骨髄性白血病（*promyelocytic*）、骨髄単球性白血病、単球性白血病および赤白血病を含む））、ならびに慢性白血病（例えば、慢性骨髄性白血病（顆粒球性白血病）および慢性リンパ性白血病）を含む）、真性赤血球増加、リンパ腫（例えば、ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、H鎖病、および固形腫瘍（これらは、以下が挙げられるが、これらに限定されない：肉腫および癌（例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮性肉腫（*endotheliosarcoma*）、リンパ管肉腫、リンパ管内皮腫、骨膜腫、中皮腫、ユーイング腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓、乳癌、卵巢癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原生癌、腎細胞癌、ヘパトーム、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫、頸部癌、精巣癌、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫（*emangioblastoma*）、聴神経鞘腫（*acoustic neuroma*）、乏突起神経膠腫、髄膜腫（*menangioma*）、黒色腫、神経芽腫、ならびに網膜芽腫）））。

【 0 4 8 3 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および／またはアンタゴニストによって処置または検出され得る、増大したアポトーシスに関連する疾患は、以下を含む：AIDS；神経変性障害（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病

、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎、小脳変性、および脳腫瘍または原発性関連疾患 (prior associated disease) ; 自己免疫障害 (例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病 (Behcet's disease)、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデス、および免疫関連糸球体腎炎 (immune-related glomerulonephritis) および慢性関節リウマチ)、脊髓形成異常症候群 (例えば、再生不良性貧血)、対宿主性移植片病、虚血性障害 (例えば、心筋梗塞、発作、および再灌流障害に起因するもの)、肝障害 (例えば、肝炎に関連する肝障害、虚血/再灌流障害、胆汁うっ滞 (cholestosis) (胆管障害)、および肝癌) ; 毒素誘導性肝疾患 (例えば、アルコールに起因するもの)、敗血症性ショック、悪液質ならびに食欲不振。

【 0 4 8 4 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および/またはアンタゴニストによって検出および/または処置され得る、過剰増殖性の疾患および/または障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: 肝、腹部、骨、胸、消化器系、脾臓、腹膜、内分泌腺 (副腎、上皮小体、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺)、眼、頭および首、神経 (中枢神経および末梢神経)、リンパ系、骨盤、皮膚、柔組織、脾臓、胸郭および泌尿性器に位置する新生物。

【 0 4 8 5 】

同様に、他の過剰増殖障害もまた、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および/またはアンタゴニストによって処置または検出され得る。このような過剰増殖障害の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: 高ガンマグロブリン血症、リンパ球増殖障害、パラプロテイン血症、紫斑病、サルコイドーシス、セザリー症候群、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、ゴシェ病、組織球増殖症、および新形成に加えて、上に列挙した器官系に位置する他の任意の過剰増殖障害。

【 0 4 8 6 】

(過剰増殖性障害)

本発明のポリヌクレオチド、もしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくは

はアンタゴニストは、過剰増殖性障害（新生物を含む）を処置または検出するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチド、もしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、直接的相互作用または間接的相互作用を通して、障害の増殖を阻害し得る。あるいは、本発明のポリヌクレオチド、もしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、過剰増殖性障害を阻害し得る他の細胞を増殖し得る。

【 0 4 8 7 】

例えば、免疫応答を増大させること、特に過剰増殖障害の抗原性の質を増大させることによって、またはT細胞を増殖、分化、もしくは動員することによって、過剰増殖障害を処置し得る。既存の免疫応答を増強するか、または新たな免疫応答を開始するかのいずれかによって、この免疫応答を増大させ得る。あるいは、免疫応答を減少させることもまた、化学療法剤のような、過剰増殖障害を処置する方法であり得る。

【 0 4 8 8 】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置または検出され得る過剰増殖障害の例としては、結腸、腹部、骨、乳房、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、上皮小体、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭部および頸部、神経（中枢および末梢）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部、ならびに泌尿生殖器に位置する新生物が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 4 8 9 】

同様に、他の過剰増殖障害もまた、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストにより処置または検出され得る。このような過剰増殖性障害の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：高ガンマグロブリン血症、リンパ球増殖性障害、パラプロテイン血症、紫斑、サルコイドーシス、セザリー症候群、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、ゴシェ病、組織球増殖症、および任意の他の過剰増殖性疾患、加えて上記に列挙した器官系に見出される新生物。

【 0 4 9 0 】

本発明のポリヌクレオチドを利用する1つの好ましい実施形態は、本発明および／または融合タンパク質もしくはそのフラグメントを用いる遺伝子治療によって、異常な細胞分裂を阻害することである。

【 0 4 9 1 】

従って、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを異常に増殖している細胞に挿入することによって、細胞増殖性障害を処置するための方法を提供し、ここでこのポリヌクレオチドはこの発現を示す。

【 0 4 9 2 】

本発明の別の実施形態は、個体における細胞増殖性障害を処置する方法を提供し、この方法は、本発明の1以上の活性遺伝子コピーを異常に増殖している1つの細胞または複数の細胞に投与することを包含する。好ましい実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドは、このポリヌクレオチドをコードするDNA配列の発現において有効な組換え発現ベクターを含むDNA構築物である。本発明の別の好ましい実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドをコードするDNA構築物は、レトロウイルスベクター、またはより好ましくは、アデノウイルスベクターを用いて、処理されるべき細胞に挿入される（G J. N a b e l ら、P N A S 1 9 9 9 9 6 : 3 2 4 - 3 2 6（これは、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。最も好ましい実施形態においては、ウイルスベクターは不完全であり、非増殖性細胞ではなく増殖性細胞のみを形質転換する。さらに、好ましい実施形態においては、単独、または他のポリヌクレオチドと組み合わせられたかもしくは融合されたかのいずれかで増殖性細胞に挿入される本発明のポリヌクレオチドは、次いで外部刺激（すなわち、磁気、特異的小分子、化学的、または薬物投与など）を介して調節され得、これはこのポリヌクレオチドの上流のプロモーターに作用し、コードされたタンパク質産物の発現を誘導する。このように、本発明の有益な治療効果は、この外部刺激に基づいて明確に調節され得る（すなわち、本発明の発現を増加、減少、または阻害する）。

【 0 4 9 3 】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、他の脈管形成タンパク質をコードする他のポリヌクレオチドと一緒に投与され得る。脈管形成タンバ

ク質としては、酸性および塩基性の線維芽細胞増殖因子、VEGF-1、VEGF-2、VEGF-3、上皮増殖因子 α および β 、血小板由来の内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、腫瘍壊死因子 α 、肝細胞増殖因子、インスリン様増殖因子、コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子、および一酸化窒素シンターゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 4 9 4 】

本発明のポリヌクレオチドは、発癌遺伝子または抗原の発現の抑制において有用であり得る。「発癌遺伝子の発現の抑制」によって、遺伝子の転写の抑制、遺伝子転写物の分解（プレメッセージ（pre-message）RNA）、スプライシングの阻害、メッセンジャーRNAの破壊、タンパク質の翻訳後修飾の予防、タンパク質の破壊、またはタンパク質の正常な機能の阻害が意図される。

【 0 4 9 5 】

異常に増殖している細胞への局所的投与のために、本発明のポリヌクレオチドは当業者に公知の任意の方法によって投与され得、この方法としては、トランスフェクション、エレクトロポレーション、細胞の微量注入、またはビヒクル（例えば、リボソーム、リボフェクチン）中で、または裸のポリヌクレオチドとして、または本明細書を通して記載される任意の他の方法が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のポリヌクレオチドは、公知の遺伝子送達系（例えば、レトロウイルスベクター（Gilboa, J. Virology 44:845 (1982) ; Hocke, Nature 320:275 (1986) ; Wilsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:3014）、ワクシニアウイルス系（Chakrabartyら、Mol. Cell Biol. 5:3403 (1985)）または当業者に公知の他の有効なDNA送達系（Yatesら、Nature 313:812 (1985)）があるが、これらに限定されない）によって送達され得る。これらの参考文献は、例示のみであり、本明細書中に参考として援用される。異常に増殖している細胞を特異的に送達またはトランスフェクトし、そして非分裂細胞を使わないために、当業者に公知のレトロウイルス、またはアデノウイルス（当該分野および本明細書中

の他のいずれかに記載のような) 送達系を使用することが好ましい。宿主DNA複製は、組み込みのためにレトロウイルスDNAを必要とし、レトロウイルスはそのライフサイクルに必要なレトロウイルス遺伝子を欠くために自己複製できないからである。このようなレトロウイルス送達系を本発明のポリヌクレオチドのために用いることによって、この遺伝子および構築物は異常に増殖している細胞を標的とし、そして非分裂正常細胞を使用しない。

【 0 4 9 6 】

本発明のポリヌクレオチドは、注射針を疾患部位に直接導くために使用される画像化デバイスの使用によって、内部器管、体腔などにおける細胞増殖性障害／疾患部位へ直接送達され得る。本発明のポリヌクレオチドはまた、外科的処置のときに疾患部位へ投与され得る。

【 0 4 9 7 】

「細胞増殖性疾患」によって、器管、腔、または身体の部分の任意の1つまたは任意の組み合わせに影響を与える、任意のヒトまたは動物の疾患もしくは障害が意味され、これは良性であるか悪性であるかに関わらず、細胞、細胞の群、または組織の単一または複数の局所的異常増殖によって特徴付けられる。

【 0 4 9 8 】

本発明のポリヌクレオチドが処置される細胞の増殖に対して生物学的に阻害する効果を有する限り、本発明のポリヌクレオチドの任意の量が投与され得る。さらに、本発明のポリヌクレオチドの1つより多くを、同じ部位へ同時に投与することが可能である。「生物学的に阻害する」によって、細胞の部分的または全体的な増殖阻害および細胞の増殖 (proliferation) または成長 (growth) の速度における減少が意味される。生物学的阻害用量は、組織培養物における標的悪性細胞増殖もしくは異常増殖細胞増殖、動物および細胞培養物における腫瘍増殖に対する本発明のポリヌクレオチドの効果を評価することによって、または当業者に公知の任意の他の方法によって決定され得る。

【 0 4 9 9 】

本発明はさらに、抗体に基づく治療に関し、この治療は、1以上の記載された障害を処置するために、抗ポリペプチド抗体および抗ポリヌクレオチド抗体を哺

乳動物（好ましくは、ヒト）患者に投与する工程を包含する。抗ポリペプチド抗体および抗ポリヌクレオチド抗体のポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体を生成するための方法は、本明細書中のいずれかに詳細に記載される。このような抗体は、当該分野において公知であるかまたは本明細書中に記載されるような薬学的に受容可能な組成物中に提供され得る。

【0500】

本発明の抗体が治療的に使用され得る方法の要旨は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを、身体中で局所的もしくは全体的に、または抗体の直接的な細胞傷害性によって（例えば、相補細胞（CDC）またはエフェクター細胞（ADCC）によって媒介されるように）結合させる工程を包含する。これらのアプローチのいくつかは、以下により詳細に記載される。本明細書中に提供される教示によって、当業者は過度の実験なしで、本発明の抗体を診断目的、モニタリング目的または治療目的のために使用する方法を理解する。

【0501】

特に、本発明の抗体、フラグメントおよび誘導体は、本明細書中に記載されるような細胞増殖性障害および／または細胞分化障害を有しているかまたは発症している被験体を処置するために有用である。このような処置は、抗体もしくはフラグメント、誘導体またはそれらの結合体の単一または複数の用量を投与する工程を包含する。

【0502】

本発明の抗体は、例えば、他のモノクロナール抗体もしくはキメラ抗体と組み合わせて、またはリンホカインもしくは造血成長因子と組み合わせて有利に使用され得、これは抗体と相互作用するエフェクター細胞の数または活性を増加させるために役立つ。

【0503】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して高親和性および／または強力なインビボ阻害および／または中和抗体、それらのフラグメントもしくは領域を、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（それらのフラグメントを含む）に関するイムノアッセイおよびそれらに関連する障害の治療の両方のた

めに使用することが好ましい。このような抗体、フラグメントまたは領域は、好ましくは、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド（それらのフラグメントを含む）に対する親和性を有する。好ましい結合親和性としては、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M および 10^{-15} M 未満の解離定数すなわち K_d を伴う結合親和性が挙げられる。

【 0 5 0 4 】

さらに、本明細書中のいずれかに記載されるように、本発明のポリペプチドは、単独で、融合タンパク質として、または他のポリペプチドと組み合わせて、直接的または間接的のいずれかで、増殖性細胞または組織の新脈管形成の阻害において有用である。最も好ましい実施形態においては、この抗新脈管形成効果は、例えば造血性細胞、腫瘍特異的細胞（例えば、腫瘍関連マクロファージ）の阻害を通して、間接的に達成され得る（Joseph I Bら、J Natl Cancer Inst, 90 (21) : 1648-53 (1998)（これは本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを指向する抗体はまた、直接的または間接的に新脈管形成の阻害を生じ得る（Witte Lら、Cancer Metastasis Rev, 17 (2) : 155-61 (1998)（これは本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。

【 0 5 0 5 】

本発明のポリペプチド（融合タンパク質を含む）またはそのフラグメントは、アポトーシスの誘導を通じた増殖性細胞または組織の阻害において有用であり得る。このポリペプチドは、デスドメインレセプター（例えば、腫瘍壊死因子（TNF）レセプター-1、CD95（Fas/APO-1）、TNFレセプター関連アポトーシス媒介タンパク質（TRAMP）およびTNF関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL）レセプター-1およびレセプター-2）の活性化において、直接的または間接的のいずれかで、増殖性細胞および組織のアポトーシスを誘導

するために作用し得る (Schulze-Osthoff Kら、Eur J Biochem 254 (3) : 439-59 (1998) (これは本明細書中に参考として援用される) を参照のこと)。さらに、本発明の別の好ましい実施形態においては、このポリペプチドは、他の機構を通して (例えば、アポトーシスを活性化する他のタンパク質の活性化において)、あるいは単独または小分子薬物もしくはアジュバント (例えば、アポプトニン (apoptonin)、ガレクチン、チオレドキシン、抗炎症タンパク質) との組み合わせのいずれかで、このタンパク質の発現の刺激を通して、アポトーシスを誘導し得る (例えば、Mutat Res 400 (1-2) : 447-55 (1998)、Med Hypotheses 50 (5) : 423-33 (1998)、Chem Biol Interact. Apr 24; 111-112 : 23-34 (1998)、J Mol Med. 76 (6) : 402-12 (1998)、Int J Tissue React; 20 (1) : 3-15 (1998) (これらはすべて本明細書中に参考として援用される) を参照のこと)。

【0506】

本発明のポリペプチド (それとの融合タンパク質もしくはそのフラグメントを含む) は、増殖性細胞または組織の転移の阻害において有用である。阻害は、ポリペプチド、または本明細書中のいずれかに記載されるようなこのポリペプチドを指向する抗体の投与の直接的な結果として、あるいは間接的に (例えば、転移を阻害することが知られているタンパク質 (例えば、 $\alpha 4$ インテグリン) の発現の活性化) 生じ得る (例えば、Curr Top Microbiol Immunol 1998; 231 : 125-41 (これは本明細書中に参考として援用される) を参照のこと)。本発明のこのような治療的効果は、単独、または小分子薬物もしくはアジュバントとの組み合わせのいずれかで達成され得る。

【0507】

別の実施形態においては、本発明は、本発明のポリペプチドを含有する組成物 (例えば、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素、またはプロドラッグに会合するポリペプチドまたはポリペプチド抗体を含有する組成物) を、本発明のポリペプチドを発現する標的細胞に送達する方法を提供する。本発明のポリペプチドまた

はポリペプチド抗体は、疎水性、親水性、イオン性および／または共有結合性相互作用を介して、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素、またはプロドラッグに会合し得る。

【 0 5 0 8 】

本発明のポリペプチド、それらとの融合タンパク質またはそれらのフラグメントは、直接的（例えば、本発明のポリペプチドが増殖性抗原および免疫原に应答するために、免疫応答を「ワクチン接種した」場合に起こるように）、または間接的（例えば、この抗原および免疫原に対する免疫応答を増強することが知られているタンパク質（例えば、ケモカイン）の発現の活性化におけるように）のいずれかで、増殖細胞または組織の免疫原性および／または抗原性の増強において有用である。

【 0 5 0 9 】

(心 臓 血 管 障 害)

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、四肢虚血のような末梢動脈疾患を含む、心臓血管障害を処置し得る。

【 0 5 1 0 】

心臓血管障害としては、動動脈瘻 (arterio-arterial fistula)、動静脈瘻、大脳動静脈先天異常、先天性心欠陥 (congenital heart defects)、肺動脈弁閉鎖症、およびシミター症候群のような心臓血管異常が挙げられる。先天性心欠陥としては、大動脈縮窄、三房心、冠状脈管奇形 (coronary vessel anomalies)、交差心、右胸心、開存性動脈管 (patent ductus arteriosus)、エプスタイン奇形、アイゼンメンガー複合体、左心室発育不全症候群、左胸心、ファロー四徴症、大血管転位症、両大血管右室起始症、三尖弁閉鎖症、動脈管遺残、および心中隔欠損症 (heart septal defects) (例えば、大動脈肺動脈中隔欠損症 (aortopulmonary septal defect)、心内膜床欠損症、リュタンバッシェ症候群、ファロー三徴症、心室心中隔欠損症 (ventricular heart sep

t a l d e f e c t s)) が挙げられる。

【 0 5 1 1 】

心臓血管障害としてはまた、不整脈、カルチノイド心臓病、高心拍出量 (h i g h c a r d i a c o u t p u t) 、低心拍出量 (l o w c a r d i a c o u t p u t) 、心タンポナーデ、心内膜炎 (細菌性を含む) 、心臓動脈瘤、心停止、うっ血性心不全、うっ血性心筋症、発作性呼吸困難、心臓水腫、心肥大、うっ血性心筋症、左心室肥大、右心室肥大、梗塞後心破裂 (p o s t - i n f a r c t i o n h e a r t r u p t u r e) 、心室中隔破裂、心臓弁疾患、心筋疾患、心筋虚血、心内膜液浸出、心外膜炎 (梗塞性および結核性を含む) 、気心膜症、心膜切開後症候群、右心疾患、リウマチ性心疾患、心室機能不全、充血、心臓血管妊娠合併症 (c a r d i o v a s c u l a r p r e g n a n c y c o m p l i c a t i o n s) 、シミター症候群、心血管梅毒、および心血管結核 (c a r d i o v a s c u l a r t u b e r c u l o s i s) のような心臓病が挙げられる。

【 0 5 1 2 】

不整脈としては、洞性不整脈、心房性細動、心房粗動、徐脈、期外収縮、アダムズ-ストークス症候群、脚ブロック、洞房ブロック、長QT症候群 (l o n g Q T s y n d r o m e) 、副収縮、ローン-ギャノン-グーレヴァイン症候群、マヘーム型早期興奮症候群 (M a h a i m - t y p e p r e - e x c i t a t i o n s y n d r o m e) 、ウルフ-バーキンソン-ホワイト症候群、洞不全症候群、頻拍、および心室性細動が挙げられる。頻拍としては、発作性頻拍、上室性頻拍、心室固有調律促進、房室結節性再入頻拍 (a t r i o v e n t r i c u l a r n o d a l r e e n t r y t a c h y c a r d i a) 、異所心房性頻拍、異所接合部頻拍、洞房結節性再入頻拍 (s i n o a t r i a l n o d a l r e e n t r y t a c h y c a r d i a) 、洞性頻拍、トルサード・ド・ポワント、および心室性頻拍が挙げられる。

【 0 5 1 3 】

心臓弁疾患としては、大動脈弁機能不全症、大動脈弁狭窄症、心雑音 (h e a r m u r m u r s) 、大動脈弁逸脱症、僧帽弁逸脱症、三尖弁逸脱症、僧帽弁

機能不全、僧帽弁狭窄症、肺動脈弁閉鎖症、肺動脈弁機能不全、肺動脈弁狭窄症、三尖閉鎖症、三尖弁機能不全、および三尖弁狭窄症が挙げられる。

【 0 5 1 4 】

心筋疾患としては、アルコール性心筋症、うっ血性心筋症、肥大型心筋症、弁下部性大動脈狭窄症、弁下部性肺動脈狭窄症、拘束型心筋症、シャーガス心筋症、心内膜線維弾性症、心内膜心筋線維症、キーンズ症候群、心筋再灌流障害、および心筋炎が挙げられる。

【 0 5 1 5 】

心筋性虚血としては、狭心症、冠動脈瘤、冠動脈硬化、冠動脈血栓症、冠動脈血管痙攣、心筋梗塞、および心筋気絶 (myocardial stunning) のような冠動脈疾患が挙げられる。

【 0 5 1 6 】

心臓血管疾患としてはまた、動脈瘤、血管形成異常、血管腫症、細菌性血管腫症状、ヒッペル＝リンダウ疾患 (Hippel-Lindau Disease)、クリペルトルノネー＝ウェーバー症候群、スタージー＝ウェーバー症候群、血管運動神経性水腫、大動脈疾患、高安動脈炎、大動脈炎、ルリー＝シュ症候群、動脈閉塞疾患、動脈炎、動脈内膜炎 (endarteritis)、結節性多発性動脈炎、脳血管障害、糖尿病性血管障害、糖尿病性網膜症、塞栓症、血栓症、先端紅痛症、痔、肝静脈閉塞障害、高血圧、低血圧、虚血、末梢血管障害、静脈炎、肺静脈閉塞疾患、高血圧、低血圧、虚血、末梢血管疾患、静脈炎、肺静脈閉塞疾患、レーノー病、CREST症候群、網膜静脈閉塞、シミター症候群、上大静脈症候群、毛細血管拡張症、毛細血管拡張性運動失調 (ataxia telangiectasia)、遺伝性出血性毛細管拡張症、精索静脈瘤、拡張蛇行静脈、静脈瘤性潰瘍、脈管炎、および静脈機能不全のような血管疾患が挙げられる。

【 0 5 1 7 】

動脈瘤としては、解離性動脈瘤、偽動脈瘤、感染した動脈瘤、破裂した動脈瘤、大動脈性動脈瘤、大脳性動脈瘤、冠動脈瘤、心動脈瘤、および腸骨性動脈瘤が挙げられる。

【 0 5 1 8 】

動脈閉塞疾患としては、動脈硬化症、間欠性跛行、頸動脈狭窄症、線維筋性形成異常、腸間膜性血管閉塞、モヤモヤ病、腎動脈閉塞、網膜動脈閉塞、および閉塞性血栓性血管炎が挙げられる。

【 0 5 1 9 】

脳血管障害としては、頸動脈疾患、脳のアミロイドアンギオパチー、大脳動脈瘤、大脳無酸素症、大脳動脈硬化、大脳動静脈先天異常、大脳動脈疾患、大脳の塞栓症および血栓症、頸動脈血栓症、洞血栓症、ヴァレンベルク症候群、大脳出血、硬膜上血腫、硬膜下血腫、クモ膜下出血 (subarachnoid hemorrhage)、大脳梗塞、大脳虚血 (一過性を含む)、鎖骨下動脈盗血症候群、室周白軟化症 (periventricular leukomalacia)、血管性頭痛、群発性頭痛、片頭痛、および椎骨基部 (vertebrobasilar) 機能不全が挙げられる。

【 0 5 2 0 】

塞栓症としては、空気塞栓症、羊水塞栓症、コレステロール塞栓症、爪先チアノーゼ症候群、脂肪塞栓症、肺動脈塞栓症、および血栓塞栓症が挙げられる。血栓症としては、冠状動脈血栓症、肝静脈血栓症、網膜静脈閉塞、頸動脈血栓症、洞血栓症、ヴァレンベルク症候群、および血栓性静脈炎が挙げられる。

【 0 5 2 1 】

虚血としては、大脳虚血、虚血性大腸炎、仕切り症候群 (compartment syndrome)、前仕切り症候群 (anterior compartment syndrome)、心筋虚血、再灌流傷害、および末梢四肢虚血が挙げられる。脈管炎としては、大動脈炎、動脈炎、ベーチェット (Behcet) 症候群、チャーグーストラウス症候群、粘膜皮膚リンパ節症候群、閉塞性血栓性血管炎、過敏性血管炎、シェーンラインーヘーノホ紫斑病 (Schoenlein-Henoch purpura)、アレルギー性皮膚血管炎およびウェーゲナー肉芽腫症が挙げられる。

【 0 5 2 2 】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくは

アンタゴニストは、危険な四肢虚血および冠状動脈疾患の処置に対して特に有効である。

【 0 5 2 3 】

ポリペプチドは、当該分野で公知である任意の方法を使用して投与され得、これらの方法としては、送達部位における直接的針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、微粒子銃 (b i o l i s t i c) 注射、粒子加速器、ゲルフォームスポンジデポー、他の市販デポー物質、浸透圧ポンプ、経口または坐剤の固形薬学的処方物、手術中のデカンティングまたは局所適用、エアロゾル送達が挙げられるが、これらに限定されない。そのような方法は当該分野で公知である。ポリペプチドは、下記でより詳細に記載される、治療剤 (T h e r a p e u t i c) の一部として投与され得る。ポリヌクレオチドを送達する方法は本明細書中でより詳細に記載される。

【 0 5 2 4 】

(抗新脈管形成活性)

新脈管形成の内因性の、刺激因子とインヒビターとの間の天然に存在する平衡は、阻害影響が優勢である平衡である。R a s t i n e j a d ら、C e l l 56 : 3 4 5 ~ 3 5 5 (1 9 8 9) 。新生血管形成が正常な生理学的条件下において生じるまれな場合 (例えば、創傷治癒、器官再生、胚発生、および雌性生殖プロセス) において、新脈管形成は、厳密に調節され、そして空間的および時間的に定められる。病的な新脈管形成の条件 (例えば、固形腫瘍増殖を特徴付ける) の下において、これらの調節の制御はできない。調節されていない新脈管形成は病的になり、そして多くの新生物性疾患および非新生物性疾患の進行を維持する。多くの重篤な疾患は、固形腫瘍の増殖および転移、関節炎、いくつかの型の眼の障害および乾癬を含む、異常な新生血管形成により支配される。例えば、M o s e s ら、B i o t e c h . 9 : 6 3 0 ~ 6 3 4 (1 9 9 1) ; F o l k m a n ら、N . E n g l . J . M e d . , 3 3 3 : 1 7 5 7 ~ 1 7 6 3 (1 9 9 5) ; A u e r b a c h ら、J . M i c r o v a s c . R e s . 2 9 : 4 0 1 ~ 4 1 1 (1 9 8 5) ; F o l k m a n , A d v a n c e s i n C a n c e r R e s e a r c h , K l e i n および W e i n h o u s e 編、A c a d e m i c P

ress, New York, 175~203頁(1985); Patz, Am. J. Ophthalmol. 94: 715~743 (1982); および Folkmanら、Science 221: 719~725 (1983) による概説を参照のこと。多くの病的状態において、新脈管形成のプロセスは、その疾患状態に寄与する。例えば、固形腫瘍の増殖が新脈管形成に依存することを示唆する有意なデータが蓄積されている。Folkman および Klagsbrun, Science 235: 442~447 (1987)。

【0525】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチド、ならびに本発明のアゴニストまたはアンタゴニストの投与による新生血管形成に関連する疾患または障害の処置を提供する。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置し得る悪性状態および転移性状態には、本明細書に記載の悪性疾患、固形腫瘍、および癌、ならびに当該分野で公知の他のもの（このような障害の総説については、Fishmanら、Medicine、第2版、J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1985) を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。従って、本発明は、新脈管形成関連疾患および／または障害の処置の方法を提供し、この方法は、治療有効量の、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを、その処置に必要な個体に投与する工程を包含する。例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、癌または腫瘍を治療的に処置するために、種々のさらなる方法で利用され得る。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストで処置され得る癌としては、前立腺癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、膵臓癌、喉頭癌、食道癌、精巣癌、肝臓癌、耳下腺癌、胆管癌、結腸癌、直腸癌、頸部癌、子宮癌、子宮内膜癌、腎臓癌、膀胱癌、甲状腺癌を含む固形腫瘍；原発性腫瘍および転移；黒色腫；膠芽腫；カポージー肉腫；平滑筋肉腫；非小細胞肺癌；結腸直腸癌；進行性(advanced)悪性疾患；および血液から生じる腫瘍（例えば、白血病）が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび

／またはアゴニストは、皮膚癌、頭頸部腫瘍、乳房腫瘍およびカポジ肉腫のような癌を処置するために、局所送達され得る。

【 0 5 2 6 】

なお他の局面において、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、例えば膀胱内投与によって膀胱癌の表面形態を処置するために利用され得る。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、腫瘍に直接的に、または注射もしくはカテーテルを介して腫瘍部位付近に送達され得る。当然のことながら、当業者が理解するように、適切な投与様式は、処置されるべき癌によって変化する。他の送達様式は本明細書中において議論される。

【 0 5 2 7 】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、癌に加えて、他の障害（新脈管形成を含む）を処置する際に有用であり得る。これらの障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：良性腫瘍（例えば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫）；動脈硬化プラーク；眼の脈管形成疾患（例えば、糖尿病性網膜症、未熟網膜症、黄斑変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖、ルベオーシス、網膜芽細胞腫、ブドウ膜炎（*uveitis*）および眼の翼状片（*Pterygia*）（異常な血管増殖））；慢性関節リウマチ；乾癬；遅延型創傷治癒；子宮内膜症；脈管形成；顆粒化；過形成性瘢痕（ケロイド）；偽関節骨折；強皮症；トラコーマ；血管接着；心筋の新脈管形成；冠状側副枝（*coronary collaterals*）；大脳側副枝；動静脈奇形；虚血性四肢新脈管形成；オースラー-ウェーバー（*Oslер-Webber*）症候群；プラーク新生血管形成；毛細血管拡張症；血友病性関節；血管線維腫；線維筋性形成異常；創傷顆粒化；クローン病；およびアテローム性動脈硬化症。

【 0 5 2 8 】

例えば、本発明の1つの局面において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを過形成性瘢痕またはケロイドに投与する工程を包含する、過形成性瘢痕およびケロイドを処置するための方法

が提供される。

【 0 5 2 9 】

本発明の1つの実施形態において、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、過形成性瘢痕またはケロイドに、これらの病変の進行を妨げるために直接注射される。この治療は、過形成性瘢痕およびケロイド（例えば、やけど）の発生を生じることが知られている状態の予防処置において特に価値があり、そして好ましくは、増殖期が進行する時間（最初の傷害の約14日後）を有した後であるが、過形成性瘢痕またはケロイドの発生の前に開始される。上述のように、本発明はまた、眼の新生血管形成疾患（例えば、角膜新生血管形成、血管新生緑内障、増殖性糖尿病網膜症、水晶体後線維増殖および黄斑変性を含む）を処置するための方法を提供する。

【 0 5 3 0 】

さらに、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド（アゴニストおよび／またはアンタゴニストを含む）を用いて処置され得る新生血管形成に関連する眼の障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：血管新生緑内障、糖尿病網膜症、網膜障害、網膜芽細胞腫、水晶体後線維増殖症、ブドウ膜炎、未熟網膜症、黄斑変性、角膜移植新生血管形成、ならびに他の眼の炎症性疾患、眼の腫瘍、および脈絡膜または虹彩の新生血管形成に関連する疾患。例えば、Walitmanら、Am. J. Ophthalmol. 85:704~710 (1978) およびGartnerら、Surv. Ophthalmol. 22:291~312 (1978) による総説を参照のこと。

【 0 5 3 1 】

従って、本発明の1つの局面において、治療有効量の化合物（上記）を患者に対して、血管の形成が阻害されるように角膜に投与する工程を包含する、角膜新生血管形成（角膜移植新生血管形成を含む）のような眼の新生血管形成疾患を処置するための方法が、提供される。簡潔には、角膜は、通常には血管を欠く組織である。しかし、特定の病的状態において、毛細血管は、緑の角膜周囲脈管叢から角膜に伸長し得る。角膜が血管化されるようになる場合、角膜はまた混濁されるようになり、患者の視力の衰えを生じる。角膜が完全に不透明になる（opa

c i t a t e) 場合に、視力喪失が完全になり得る。広範な種々の障害は、例えば、以下を含む角膜新生血管形成を生じ得る：角膜感染（例えば、トラコーマ、単純ヘルペス角膜炎、リーシュマニア症およびオンコセルカ症）、免疫学的プロセス（例えば、移植片拒絶およびスティーヴンズ・ジョンソン症候群）、アルカリやけど、外傷、炎症（任意の原因による）、毒性および栄養欠乏状態、ならびにコンタクトレンズを装着することの合併症として。

【 0 5 3 2 】

特に好ましい実施形態において、本発明は、生理食塩水（眼に用いる調製物において一般に使用される任意の保存剤および抗菌剤と組合せて）中で局所投与のために調製され得、そして点眼剤形態で投与され得る。溶液または懸濁液は、その純粋な形態で調製され得、そして1日に数回投与され得る。あるいは、上記のように調製される抗脈管形成組成物はまた、角膜に直接投与され得る。好ましい実施形態において、抗脈管形成組成物は、角膜に結合する粘膜接着性ポリマーとともに調製される。さらなる実施形態において、抗脈管形成因子または抗脈管形成組成物は、従来のステロイド治療に対する補助剤として利用され得る。局所治療はまた、脈管形成応答（例えば、化学的やけど）を誘導する高い可能性を有することが公知である角膜病変において予防的に有用であり得る。これらの場合において、処置（おそらくステロイドと組み合わせられる）は、その後の合併症を予防するのを補助するために直ちに開始され得る。

【 0 5 3 3 】

他の実施形態において、上記の化合物は、角膜支質に直接、顕微鏡の案内の下で眼科医によって注入され得る。好ましい注射部位は、個々の病巣の形態で変化するが、投与の目標は、脈管構造の前進している面に組成物を置くこと（すなわち、血管と正常な角膜との間に分散される）である。ほとんどの場合において、これは、前進している血管から角膜を「防御」するための縁周囲（p e r i l i m b i c）角膜注射を含む。この方法はまた、角膜新生血管形成を予防的に防ぐために、角膜傷害の直後に利用され得る。この状況において、この物質は、角膜病巣とその所望されない潜在的な血液供給の縁との間に分散して縁周囲角膜に注射され得る。このような方法はまた、類似の様式で、移植された角膜の毛細血

管浸潤を予防するために利用され得る。徐放形態において、注入は、1年に2～3回のみ必要とされ得る。ステロイドもまた、注入溶液に添加され、その注射自体から生じる炎症を低減し得る。

【 0 5 3 4 】

本発明の別の局面において、患者に、血管の形成を阻害するように、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、血管新生緑内障を処置するための方法が提供される。1つの実施形態において、化合物は、血管新生緑内障の早期形態を処置するために、眼に局所投与され得る。他の実施形態において、化合物は、前方角 (a n t e r i o r c h a m b e r a n g l e) の領域に注入によって移植され得る。他の実施形態において、化合物はまた、化合物が眼房水に連続的に放出されるように、任意の位置に置かれ得る。本発明の別の局面において、患者に、血管の形成が阻害されるように、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、増殖性糖尿病性網膜症を処置するための方法が提供される。

【 0 5 3 5 】

本発明の特に好ましい実施形態において、増殖性糖尿病性網膜症は、網膜におけるポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストの局所濃度を増加させるために、眼房水または硝子体への注入によって処置され得る。好ましくは、この処置は、光凝固を必要とする重篤な疾患の獲得の前に開始されるべきである。

【 0 5 3 6 】

本発明の別の局面において、血管の形成が阻害されるように、患者に、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、水晶体後線維増殖症を処置するための方法が、提供される。化合物は、硝子体内注射を介して、および／または眼内移植を介して局所投与され得る。

【 0 5 3 7 】

さらに、このポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはア

ゴニストで処置され得る障害としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：血管腫、関節炎、乾癬、血管線維腫、アテローム性動脈硬化症斑、遅延型創傷治癒、顆粒化、血友病性関節、過形成性瘢痕、偽関節骨折、オースラー-ウェーバー (Osler-Weber) 症候群、化膿性肉芽腫、強皮症、トラコーマ、および血管接着。

【 0 5 3 8 】

さらに、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴニストで処置され得る障害および／または状態としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：固形腫瘍、血液由来の (blood born) 腫瘍 (例えば、白血病)、腫瘍転移、カボージ肉腫、良性腫瘍 (例えば、血管腫、聴神経鞘腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫)、慢性関節リウマチ、乾癬、眼の脈管形成疾患 (例えば、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、黄斑変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖症、ルベオーシス、網膜芽細胞腫、およびブドウ膜炎 (uveitis))、遅延型創傷治癒、子宮内膜症、脈管形成、顆粒化、過形成性瘢痕 (ケロイド)、偽関節骨折、強皮症、トラコーマ、血管接着、心筋の新脈管形成、冠状側副枝 (coronary collaterals)、大脳側副枝、動静脈奇形、虚血性四肢新脈管形成、オースラー-ウェーバー症候群、ブランク新生血管形成、毛細血管拡張症、血友病性関節、血管線維腫、線維筋性形成異常、創傷顆粒化、クローン病、アテローム性動脈硬化症、産児制限薬剤 (月経を制御する、胎芽着床のために必要な血管新生を予防することによる)、病気の結果 (例えば、引っかけ病 (Rochelle minallia quintosa)、潰瘍 (ヘリコバクターピロリ (Helicobacter pylori))、バルトネラ症および細菌性血管腫症状) のような新脈管形成を有する疾患。

【 0 5 3 9 】

出産制限方法の1つの局面において、胎芽着床をブロックするのに十分な化合物の量は、性交および受精が起こる前またはその後に投与され、このようにして出産制限の有効な方法、おそらく「事後用 (morning after)」方法を提供する。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴ

ニストはまた、月経を制御することにおいて使用され得るか、または子宮内膜症の処置における腹膜洗浄液として、もしくは腹膜移植のためのいずれかで投与され得る。

【 0 5 4 0 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴニストは、縫合 (s t i t c h) 肉芽腫を予防するために、外科縫合に組み込まれ得る。

【 0 5 4 1 】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴニストは、広範な種々の外科手順において利用され得る。例えば、本発明の1つの局面において、組成物（例えば、スプレーまたはフィルムの形態において）は、悪性組織から正常な周囲の組織を分離するため、そして／または周囲の組織への疾患の広がりを予防するために、腫瘍の除去の前に、領域をコートまたはスプレーするために利用され得る。本発明の他の局面において、組成物（例えば、スプレーの形態において）は、腫瘍をコートするため、または所望の場所において新脈管形成を阻害するために、内視鏡手順を介して送達され得る。本発明のなお他の局面において、本発明の抗脈管形成組成物でコートされている外科メッシュが、外科メッシュが利用され得る任意の手順において利用され得る。例えば、本発明の1つの実施形態において、抗脈管形成組成物を有した外科メッシュレーデン (l a d e n) は、構造に対する支持を提供するため、そして一定の量の抗脈管形成因子を放出するために、腹部癌切除手術の間（例えば、結腸切除の後）に利用され得る。

【 0 5 4 2 】

本発明のさらなる局面において、腫瘍切除部位を処置するための方法が提供される。この方法は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニスト、および／またはアゴニストを、切除後に腫瘍の切除縁に投与して、その結果、その部位での、癌の局所的再発および新血管形成を阻害するようにする工程を包含する。本発明の1つの実施形態において、この抗脈管形成化合物は、腫瘍切除部位に直接投与される（例えば、この抗脈管形成化合物を用いて、腫瘍の切除縁に綿棒で

塗るか、ブラシで塗るか、または他の方法でコーティングすることによって塗布される)。あるいは、この抗脈管形成化合物は、投与の前に、公知の手術用ペーストに組み込まれ得る。本発明の特に好ましい実施形態において、この抗脈管形成化合物は、悪性疾患の肝切除の後、および神経外科的手術の後に塗布される。

【 0 5 4 3 】

本発明の1つの局面において、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストは、広範な種類の腫瘍(例えば、胸部腫瘍、結腸腫瘍、脳腫瘍、および肝腫瘍を含む)の切除縁に投与され得る。例えば、本発明1つの実施形態において、抗脈管形成化合物が、神経学的腫瘍の部位に、切除の後に投与され得、その結果、その部位での新規な血管の形成が阻害される。

【 0 5 4 4 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストはまた、他の抗脈管形成因子とともに投与され得る。他の抗脈管形成因子の代表例としては、以下が挙げられる: 抗侵襲性 (i n v a s i v e) 因子、レチン酸およびその誘導体、バクリタキセル、スラミン、メタロプロテイナーゼ-1の組織インヒビター、メタロプロテイナーゼ2の組織インヒビター、プラスミノゲン活性化因子インヒビター1、プラスミノゲン活性化因子インヒビター2、および種々の形態の軽い方の (l i g h t e r) 「d群」遷移金属。

【 0 5 4 5 】

軽い方の「d群」遷移金属としては、例えば、バナジウム、モリブデン、タングステン、チタン、ニオブ、およびタンタル種が、挙げられる。このような遷移金属種は、遷移金属錯体を形成し得る。上記の遷移金属種の適切な錯体は、オキソ遷移金属錯体を含む。

【 0 5 4 6 】

バナジウム錯体の代表的例は、オキソバナジウム錯体(例えば、バナジン酸塩錯体およびバナジル錯体)を含む。適切なバナジン酸塩錯体は、メタバナジン酸塩錯体およびオルトバナジウム酸塩錯体(例えば、メタバナジン酸アンモニウム、メタバナジン酸ナトリウム、およびオルトバナジン酸ナトリウム)を含む。適切なバナジル錯体は、例えば、バナジルアセチルアセトネートおよび硫酸バナジ

ル（硫酸バナジル水和物（例えば、硫酸バナジルー水和物および硫酸バナジル三水和物）を含む）を含む。

【 0 5 4 7 】

タングステン錯体およびモリブデン錯体の代表的例もまた、オキソ錯体を含む。適切なオキソタングステン錯体は、タングステン酸塩錯体および酸化タングステン錯体を含む。適切なタングステン酸塩錯体は、タングステン酸アンモニウム、タングステン酸カルシウム、タングステン酸ナトリウム二水和物、およびタングステン酸を含む。適切な酸化タングステンは、酸化タングステン（IV）および酸化タングステン（VI）を含む。適切なオキソモリブデン錯体は、モリブデン酸塩錯体、酸化モリブデン錯体、およびモリブデニル錯体を含む。適切なモリブデン酸塩錯体は、モリブデン酸アンモニウムおよびその水和物、モリブデン酸ナトリウムおよびその水和物、ならびにモリブデン酸カリウムおよびその水和物を含む。適切な酸化モリブデンは、酸化モリブデン（VI）、酸化モリブデン（VI）、およびモリブデン酸を含む。適切なモリブデニル錯体は、例えば、モリブデニルアセチルアセトネートを含む。他の適切なタングステン錯体およびモリブデン錯体は、例えば、グリセロール、酒石酸および糖から誘導された、ヒドロキソ誘導体を含む。

【 0 5 4 8 】

広範な種類の他の抗脈管形成因子もまた、本発明の状況において利用され得る。代表的例は、以下を含む：血小板第4因子；硫酸プロタミン；硫酸化キチン誘導体（クイーンクラブ（queen crab）の殻から調製される）（Murataら、Cancer Res. 51:22~26、1991）；硫酸化多糖ペプチドグリカン複合体（SP-PG）（この化合物の機能は、ステロイド（例えば、エストロゲンおよびクエン酸タモキシフェン）の存在によって、増強され得る）；スタウロスボリン；基質代謝の調節因子（例えば、プロリンアナログ、シスヒドロキシプロリン、d, L-3, 4-デヒドロプロリン、チアプロリン、 α , α -ジピリジル、アミノプロピオニトリルフマレートを含む）；4-プロピル-5-(4-ピリジニル)-2(3H)-オキサゾロン；メトトレキサート；ミトザントロン；ヘパリン；インターフェロン；2マクログロブリン-血清；C

hIMP-3 (Pavloffら、J. Bio. Chem. 267:17321~17326、1992) ; キモスタチン (Tomkinsonら、Biochem J. 286:475~480、1992) ; シクロデキストリンテトラデカサルフェート ; エポネマイシン (Eponemycin) ; カンプトテシン ; フマギリン (Ingberら、Nature 348:555~557、1990) ; チオリンゴ酸金ナトリウム (「GST」 ; MatsubaraおよびZiff、J. Clin. Invest. 79:1440~1446、1987) ; アンチコラゲナーゼー血清 ; $\alpha 2$ -抗プラスミン (Holmesら、J. Biol. Chem. 262(4):1659~1664、1987) ; ビサントレン (Bisantrene) (National Cancer Institute) ; ロベンザリットニナトリウム (N-(2)-カルボキシフェニル-4-クロロアントロニル酸 (chloroanthronilic acid) ニナトリウム、または「CCA」 ; Takeuchiら、Agents Actions 36:312~316、1992) ; サリドマイド ; Angostatic ステロイド ; AGM-1470 ; カルボキシアミノイミダゾール (carboxynaminolimidazole) ; およびメタロプロテイナーゼインヒビター (例えば、BB94) 。

【 0 5 4 9 】

(細胞レベルでの疾患)

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアンタゴニストまたはアゴニストによって、処置または検出され得る、細胞生存の増大またはアポトーシスの阻害に関連する疾患には、以下が挙げられる：癌（例えば、濾胞性リンパ腫、p53変異を伴う癌腫、およびホルモン依存性腫瘍。これらは以下を含むが、これらに限定されない：結腸癌、心臓腫瘍、膵臓癌、黒色腫、網膜芽細胞腫、神経膠芽細胞腫、肺癌、腸の癌、精巣癌、胃癌、神経芽細胞腫、粘液腫、筋腫、リンパ腫、内皮腫、骨芽細胞腫、破骨細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、腺腫、乳癌、前立腺癌、カポージ肉腫および卵巣癌）；自己免疫障害（例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病、クロール病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎ならび

に慢性関節リウマチ)、ならびにウイルス感染(例えば、ヘルペスウイルス、ポックスウイルスおよびアデノウイルス)、炎症、対宿主性移植片病、急性移植片拒絶、ならびに慢性移植片拒絶。

【 0 5 5 0 】

好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび/またはアンタゴニストは、特に上記に列挙されたものにおいて、癌の増殖、進行、および/または転移(metastasis)を阻害するために使用される。

【 0 5 5 1 】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはアゴニストまたはアンタゴニストによって処置または検出され得る、細胞生存の増大に関連するさらなる疾患または状態には、悪性疾患の進行および/または転移ならびに以下のような関連する障害が挙げられるが、これらに限定されない:白血病(急性白血病(例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病(骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病を含む)を含む)ならびに慢性白血病(例えば、慢性骨髄性(顆粒球性)白血病および慢性リンパ性白血病))、真性赤血球増加症、リンパ腫(例えば、ホジキン病および非ホジキン病)、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、H鎖病、ならびに固形腫瘍(以下を含むが、これらに限定されない:肉腫および癌腫(例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫(endotheliosarcoma)、リンパ管肉腫、リンパ管内皮腫、骨膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原生癌、腎細胞癌、肝細胞癌腫、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、頸部癌、精巣の腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、神経膠星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫(meningioma)、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫))。

【 0 5 5 2 】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストによって処置または検出され得る、アポトーシスの増大に関連する疾患には、以下が挙げられる：AIDS；神経変性障害（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎、小脳変性および脳腫瘍または先の関連した疾患）；自己免疫障害（例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫複合体糸球体腎炎ならびに慢性関節リウマチ）、脊髄形成異常症候群（例えば、再生不良性貧血）、対宿主性移植片病、虚血性損傷（心筋梗塞、発作および再灌流損傷によって生じるようなもの）、肝臓損傷（例えば、肝炎関連肝臓損傷、虚血／再灌流損傷、胆汁うっ滞（cholestosis）（胆管損傷）および肝臓癌）；毒物誘導性肝臓疾患（アルコールによって生じるようなもの）、敗血症性ショック、悪液質ならびに食欲不振。

【 0 5 5 3 】

（創傷治癒および上皮細胞増殖）

本発明のなおさらなる局面に従って、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストを、治療目的のため、例えば、創傷治癒の目的のために上皮細胞増殖および基底ケラチノサイトを刺激するため、ならびに毛包産生および皮膚創傷の治癒を刺激するために、利用するためのプロセスが提供される。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、およびアゴニストまたはアンタゴニストは、以下を含む創傷治癒を刺激することにおいて臨床的に有用であり得る：外科的創傷、切除の創傷、深い創傷（真皮および表皮の損傷を含む）、眼の組織の創傷、歯の組織の創傷、口腔の創傷、糖尿病性潰瘍、皮膚の潰瘍、肘の潰瘍、動脈性の潰瘍、静脈うっ滞潰瘍、熱への曝露または化学物質から生ずる熱傷、および他の異常な創傷治癒状態（例えば、尿毒症、栄養失調、ビタミン欠乏、ならびにステロイド、放射線療法および抗腫瘍性薬物および代謝拮抗物質を用いる全身性処置に関連する合併症。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、皮膚の損失の後の皮膚の回復を促進するために使用され得る。

【 0 5 5 4 】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、創傷床 (wound bed) への皮膚移植片の付着を増大するため、および創傷床からの再上皮形成を刺激するために使用され得る。以下は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストが創傷床への付着を増大するために使用され得る、移植片の型である：自家移植片、人工皮膚、同種移植片 (allograft)、自己植皮片、自己表皮移植片 (autoepidermic graft)、無血管性 (avascular) 移植片、ブレアーブラウン移植片、骨移植片、胚胎組織移植片、真皮移植片、遅延移植片、皮膚移植片、表皮移植片、筋膜移植片、全層皮膚移植片、異種移植片 (heterologous graft)、異種移植片 (xenograft)、同種移植片 (homologous graft)、増殖性移植片、層板状の移植片、網状移植片、粘膜移植片、オリエーティールシュ移植片、大網移植片 (omentopial graft)、パッチの移植片、茎状移植片、全層移植片 (penetrating graft)、分層植皮片 (split skin graft)、分層植皮片 (thick split graft)。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、皮膚の強度を助長するため、および高齢の皮膚の外見を改善するために使用され得る。

【 0 5 5 5 】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、肝細胞増殖、および肺、乳房、膵臓、胃、小腸 (small intestine)、および大腸における上皮細胞増殖における変化を生じると考えられる。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、上皮細胞 (例えば、皮脂細胞 (sebocyte)、毛包、肝実質細胞、肺胞上皮細胞 II 型 (type II pneumocyte)、ムチン産生杯細胞、および他の上皮細胞、ならびに皮膚、肺、肝臓、および胃腸管内に含まれるそれらの先祖) の増殖を促進し得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、アゴニストもしくはアンタゴニ

ストは、内皮細胞、ケラチノサイト、および基底ケラチノサイトの増殖を促進し得る。

【 0 5 5 6 】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、照射、化学療法処置またはウイルス感染から生じる腸の毒性の副作用を低減するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、小腸粘膜上で細胞保護的な効果を有し得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、化学療法およびウイルス感染から生じる粘膜炎 (m u c o s i t i s) (口粘膜) の治癒を刺激し得る。

【 0 5 5 7 】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、熱傷を含む、完全なおよび部分的な厚さの皮膚欠損における皮膚の十分な再生 (すなわち、毛包、汗腺、および皮脂腺の再増殖)、乾癬のような他の皮膚欠損の処置においてさらに使用され得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、表皮水疱症、これらの損傷の再上皮形成を促進することによる頻繁な開放性かつ疼痛性の水疱を生じる下にある真皮への表皮の接着における欠損を処置するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、胃潰瘍および十二指腸潰瘍を処置し、そして粘膜の内層の瘢痕形成ならびにより迅速な腺の粘膜および十二指腸の粘膜の内層の再生による治癒を助けるために使用され得る。炎症性腸疾患 (例えば、クローン病および潰瘍性大腸結腸炎) は、それぞれ、小腸または大腸の粘膜表面の崩壊を生じる疾患である。従って、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、粘膜表面の再表面化 (r e s u l f a c i n g) を促進して、より迅速な治癒を助けるため、および炎症性腸疾患の進行を予防するために、使用され得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、アゴニストもしくはアンタゴニストを用いる処置は、胃腸

管全体の粘膜の産生に対して有意な効果を有することが予測され、そして腸粘膜を、摂取されたかまたは外科手術後の有害な物質から保護するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、本発明のポリヌクレオチドの発現下に関連する疾患を処置するために使用され得る。

【 0 5 5 8 】

さらに、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、種々の病的状態に起因する肺への損傷を予防および治癒するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および/またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、急性または慢性の肺損傷を予防または処置するために、増殖および分化を刺激し得、そして肺胞および気管支 (b r o c h i o l a r) 上皮の修復を促進し得る。例えば、気管支上皮および肺胞 (a v e o l i) の壊死を生じる、気腫 (これは、肺胞の進行性の損失を生じる) および吸入損傷 (すなわち、煙の吸入および熱傷から生じる) は、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストを使用して効果的に処置され得る。また、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、肺胞上皮細胞 I I 型の増殖および分化を刺激するために使用され得、これは、未熟な乳児における硝子膜疾患 (例えば、乳児呼吸窮迫症候群および気管支肺異形成症) のような疾患を処置または予防することを助け得る。

【 0 5 5 9 】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、肝実質細胞の増殖および分化を刺激し得、そして従って、肝臓疾患および病状 (例えば、肝硬変により生じる劇症肝不全、肝炎ウイルスおよび毒性物質 (すなわち、アセトアミノフェン、四塩化炭素 (c a r b o n t e t r a h o l o r i d e) 、および他の当該分野で公知の肝臓毒素) により生じる肝臓損傷) を緩和または処置するために使用され得る。

【 0 5 6 0 】

さらに、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニス

トもしくはアンタゴニストは、真性糖尿病の発症を処置または予防するために使用され得る。新たにⅠ型糖尿病およびⅡ型糖尿病と診断された患者において、いくつかの島細胞機能が残っている場合、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、その疾患の持続性の発現を緩和、遅延または予防するように、その島機能を維持するために使用され得る。また、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、島細胞機能を改善または促進するための島細胞移植における補助として使用され得る。

【 0 5 6 1 】

(内 分 泌 障 害)

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、ホルモンバランスに関連する障害および／または疾患、ならびに／あるいは内分泌系の障害または疾患を処置、診断、および／または予後し得る。

【 0 5 6 2 】

内分泌系の腺により分泌されるホルモンは、身体発育、性的機能、代謝、および他の機能を制御する。所為外は、2つの方法で分類される：ホルモンの産生における障害、およびホルモンに応答する組織の不全。これらのホルモンアンバランスおよび内分泌系疾患、障害または状態の病因は、遺伝的、体細胞性（例えば、癌およびいくつかの自己免疫疾患）、後天性（例えば、化学治療、損傷または毒素によって）、または感染性であり得る。さらに、本はUT名のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、内分泌系および／またはホルモンアンバランスに関連する特定の疾患または障害のマーカーまたはディテクターとして使用され得る。

【 0 5 6 3 】

内分泌系および／またはホルモンアンバランスおよび／または疾患は、子宮運動の障害を含み、これには以下が挙げられるが、これらに限定されない：妊娠および分娩時の合併症（例えば、早期分娩、過期妊娠、自然流産、ならびに遅延分娩およびとめられた分娩）；ならびに月経周期の障害および／または疾患（例え

ば、月経困難症および子宮内膜症)。

【 0 5 6 4 】

内分泌系および／またはホルモンアンバランス障害および／または疾患としては、膵臓の障害および／または疾患(例えば、真性糖尿病、尿崩症、先天性白内障欠損、褐色細胞腫－島細胞症候群)；副腎の障害および／または疾患(例えば、アディソン病、コルチコステロイド欠損、男性化作用疾患、多毛症、クッシング症候群、高アルドステロン症、褐色細胞腫)；下垂体の障害および／または疾患(例えば、下垂体機能亢進症、下垂体機能低下症、下垂体性小人症、下垂体腺腫、汎下垂体機能低下症、先端巨大症、巨人症)；甲状腺の障害および／または疾患(甲状腺機能亢進症、甲状腺機能低下症、プラマー病、グレーヴズ病(毒性散在甲状腺腫)、毒性小結節甲状腺腫、甲状腺炎(橋本甲状腺炎、亜急性肉芽腫性甲状腺炎、およびサイレントリンパ球性甲状腺炎)、ペンドレッド症候群、粘液水腫、クレチン病、甲状腺中毒症、甲状腺ホルモン縮合障害、チミン形成不全症、甲状腺のヒュルトレ細胞腫瘍、甲状腺癌、甲状腺悪性腫瘍、髄様甲状腺癌が挙げられるが、これらに限定されない)；副甲状腺の障害および／または疾患(例えば、上皮小体機能亢進症、上皮小体機能低下症)；視床下部の障害および／または疾患。

【 0 5 6 5 】

特定の実施形態において、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび／もしくはポリペプチドならびに／またはこれらのポリペプチド(抗体を含む)のアゴニストもしくはアンタゴニスト、ならびにこれらのポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよびアンタゴニストのフラグメントおよび改変体は、異常なグルコース代謝またはグルコースの細胞への取り込みに関連した疾患および障害を診断、予後、処置、予防、または改善するために使用され得る。

【 0 5 6 6 】

特定の実施形態において、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび／もしくはポリペプチドならびに／またはそのアゴニストおよび／もしくはアンタゴニストは、I型糖尿病(インシュリン依存性糖尿病、IDDM)を診断、予後、処置、予防、および／または改善するために使用され得る。

【 0 5 6 7 】

別の実施形態において、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび／もしくはポリペプチドならびに／またはそのアゴニストおよび／もしくはアンタゴニストは、I I 型糖尿病（インシュリン耐性糖尿病）を診断、予後、処置、予防、および／または改善するために使用され得る。

【 0 5 6 8 】

さらに、他の実施形態において、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび／もしくはポリペプチドならびに／またはそのアンタゴニスト（特に中和抗体またはアンタゴニストの抗体）が、以下を含む（I 型またはI I 型）糖尿病に関連する状態を診断、予後、処置、予防、または改善するために使用され得るが、これらに限定されない：糖尿病ケトアシドーシス、糖尿病昏睡、非ケトーシス型高グリシン高アミラーゼ血症昏睡、発作（*seizure*）、精神錯乱、嗜眠状態、循環器病（例えば、心臓病、アテローム硬化症、微小血管病、高血圧、発作（*stroke*）、ならびに「心血管障害」の節において記載されるような他の疾患および障害）、異脂肪血症、腎疾患（例えば、腎不全、腎症ならびに「腎障害」の節において記載されるような他の疾患および障害）、神経損傷、神経障害、視覚障害（例えば、糖尿病網膜症および盲目）、潰瘍および創傷治癒減損、感染（例えば、「感染性疾患」の節において記載されるような、特に尿管および皮膚の感染性疾患および障害）、手根管症候群およびデュブユイトラン拘縮。

【 0 5 6 9 】

他の実施形態において、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび／もしくはポリペプチドならびに／またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、動物の重量を調節するために、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトに投与される。特定の実施形態において、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび／もしくはポリペプチドならびに／またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、インシュリンを含む生化学的経路を調節することによって、動物の重量を制御するために、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトに投与される。なお他の実施形態において、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび／もしくはポリペプチドならびに／またはそのアゴニストも

しくはアンタゴニストは、インシュリン様増殖因子を含む生化学的経路を調節することによって、動物の重量を制御するために、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトに投与される。

【 0 5 7 0 】

さらに、内分泌系および／またはホルモンアンバランス障害および／または疾患はまた、癌を含む精巣または卵巣の障害および／または疾患を含み得る。他の精巣または卵巣の障害および／または疾患としては、例えば、卵巣癌、多嚢胞性卵巣症候群、クラインフェルター症候群、パニング精巣症候群（両側性無精巣）、ライディヒ細胞先天性欠損、潜伏精巣症、ヌーナン症候群、筋緊張性ジストロフィー、精巣の毛細血管種（良性）、精巣の新形成および新精巣。

【 0 5 7 1 】

さらに、内分泌系およびまたはホルモンアンバランス障害および／または疾患はまた、多内分泌腺機能低下症候群、褐色細胞腫、神経芽細胞腫、多発性内分泌腺腫症、ならびに内分泌組織の障害および／または癌を含み得る。

【 0 5 7 2 】

（神経活性および神経学的疾患）

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよびアゴニストもしくはアンタゴニストは、脳および／または神経系の疾患、障害、損傷、または傷害の診断および／または処置に用いられ得る。本発明の組成物（例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニスト）を用いて処置され得る神経系の障害としては、軸索の切断、ニューロンの減少もしくは変性、または脱髄のいずれかを引き起こす、神経系損傷および疾患または障害が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の方法に従って、患者（ヒト患者および非ヒト哺乳動物患者を含む）において処置され得る神経系病変には、以下の中枢神経系（脊髄、脳を含む）または末梢神経系のいずれかの病変が挙げられるが、これらに限定されない：（１）虚血病変（ここで、神経系の一部における酸素不足により、ニューロンの損傷または死が生じ、これには大脳梗塞もしくは虚血、または脊髄梗塞もしくは虚血が挙げられる）；（２）外傷病変（身体的損傷により生じるかまたは手術に関連する病変、例えば、神経系的一部分を切断する病

変、または圧縮損傷を含む) ; (3) 悪性病変(ここで、神経系の一部分は、神経系関連悪性疾患もしくは非神経系組織由来の悪性疾患のいずれかである悪性組織により破壊または損傷される) ; (4) 感染性病変(ここで、神経系の一部分は、例えば、膿瘍による感染の結果として、破壊または損傷されるか、あるいはヒト免疫不全ウイルス、帯状ヘルペスもしくは単純ヘルペスウイルスによる感染と関連するか、ライム病、結核、梅毒に関連する) ; (5) 変性病変(ここで、神経系の一部分は、変性プロセスの結果として破壊または損傷され、これには、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンティングトン舞踏病または筋萎縮性側索硬化症(A L S)に関連する変性が挙げられるが、これらに限定されない) ; (6) 栄養性の疾患または障害に関連する病変(ここで、神経系の一部分は、栄養障害または代謝障害によって破壊または損傷され、これには、ビタミンB 1 2 欠乏症、葉酸欠乏症、ヴェルニッケ病、タバコ-アルコール弱視、マルキアファ-ヴァービニャーミ病(脳梁の一次変性)およびアルコール小脳変性が挙げられるが、これらに限定されない) ; (7) 全身性疾患に関連する神経性病変(糖尿病(糖尿病性ニューロパシー、ベル麻痺)、全身性エリテマトーデス、癌または類肉腫症が挙げられるが、これらに限定されない) ; (8) 毒性物質(アルコール、鉛または特定の神経毒を含む)により生じる病変; ならびに(9) 脱髄性病変(ここで、神経系の一部分は、脱髄性疾患によって破壊または損傷され、これには、多発性硬化症、ヒト免疫不全ウイルス関連脊髄障害、横断脊髄障害または種々の病因、進行性多病巣性白質脳症、および橋中央ミエリン溶解が挙げられるが、これらに限定されない)。

【 0 5 7 3 】

1つの実施形態において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、低酸素症の損傷効果から神経細胞を保護するために用いられる。さらに好ましい実施形態では、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳低酸素症の損傷効果から神経細胞を防御するために用いられる。この実施形態によると、本発明の組成物は、大脳低酸素症に関連する神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。この実施形態の1つの非排他的局面において、本発明のポリ

ペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳虚血と関連する神経細胞損傷を処置、または予防するために用いられる。この実施形態の非限定的な別の局面において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳梗塞症に関連する神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。

【 0 5 7 4 】

別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、発作に関連する神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、発作に関連する大脳神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。

【 0 5 7 5 】

別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、心臓発作に関連する神経細胞損傷を処置または予防するために使用される。特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、心臓発作に関連する大脳神経細胞損傷を処置または予防するために使用される。

【 0 5 7 6 】

神経系障害を処置または予防するために有用な本発明の組成物は、ニューロンの生存または分化の促進における生物学的活性について試験することによって選択され得る。（限定の目的ではないが）例えば、以下の効果のいずれかを誘発する本発明のガレクチン11組成物は、本発明に従って有用であり得る：（1）培養物中のニューロンの増加した生存時間；（2）培養物中またはインビボにおけるニューロンの増加した出芽；（3）培養物中またはインビボにおけるニューロン関連分子（例えば、運動ニューロンに関しては、コリンアセチルトランスフェラーゼまたはアセチルコリンエステラーゼ）の増加した生成；あるいは（4）インビボにおけるニューロン機能不全減少した症状。このような効果は、当該分野において公知の任意の方法によって測定され得る。好ましい、非限定的な実施形態においては、ニューロンの増加した生存は、本明細書中に記載されるか、そう

でなければ当該分野において公知の方法（例えば、Arakawaら（J. Neurosci. 10:3507-3515（1990））に記載される方法）を用いて慣習的に測定され得；ニューロンの増加した出芽は、当該分野において公知の方法（例えば、Pestronkら（Exp. Neurol. 70:65-82（1980））またはBrownら（Ann. Rev. Neurosci. 4:17-42（1981））に記載される方法）によって検出され得；ニューロン関連分子の増加した生成は、当該分野で公知であり、測定されるべき分子に依存した技術を用いて、バイオアッセイ、酵素アッセイ、抗体結合、ノーザンブロットアッセイなどによって測定され得；そして運動ニューロン機能不全は、運動ニューロン障害の物理的症狀（例えば、弱さ、運動ニューロン伝導速度または機能的障害）を評価することによって測定され得る。

【0577】

特定の実施形態において、本発明に従って処置され得る運動ニューロンの障害には、運動ニューロンおよび神経系の他の成分に影響を与え得る障害（例えば、梗塞、感染、毒素への暴露、外傷、外科的損傷、変性疾患、または悪性腫瘍）、ならびにニューロンに選択的に影響する障害（例えば、筋萎縮性側索硬化症）が挙げられるが、これらに限定されず、そしてこれには、進行性脊髄性筋萎縮症、進行性球延髄麻痺、原発性側索硬化症、小児筋萎縮および若年性筋萎縮、小児期の進行性球麻痺（ファチオーロンデ病）、ポリオおよびポリオ後症状、ならびに遺伝性運動感覚性神経障害（シャルコー-マリー-トゥース病）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0578】

さらに、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、ニューロン生存、シナプス形成；伝達；神経分化などにおいて役割を果たし得る。従って、本発明の組成物（PTPaseポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびアゴニストまたはアンタゴニストを含む）は、学習および／または認識の障害を含むがこれに限定されない、これらの役割に関連する疾患または障害を、診断、および／または処置または予防するのに用いられ得る。本発明の組成物はまた、神経変性性疾患状態および／または行動障害の処置または予防において有用であり得る。この

ような神経変性性疾患状態および／または行動障害としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、ツレット症候群、精神分裂病、躁病、痴呆、偏執症、強迫性障害、恐慌性障害、学習障害、ALS、精神病、自閉、および行動変化（栄養補給、睡眠パターン、平衡、および知覚の障害を含む）。さらに、本発明の組成物はまた、発生中の胚、または伴性障害に関連する発生の障害の処置、予防および／または検出において役割を果たし得る。

【 0 5 7 9 】

さらに、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストまたはアンタゴニストは、以下を含むが挙げられるがこれらに限定されない脳血管障害に関連する、疾患、傷害、障害または、損傷から、神経細胞を防御するのに有用であり得る：頸動脈疾患（例えば、頸動脈血栓症、頸動脈狭窄またはモヤモヤ病）、脳のアミロイドアンギオパチー、大脳動脈瘤、脳無酸素症、大脳動脈硬化症、大脳動静脈奇形、大脳動脈疾患、脳塞栓症および血栓（例えば、頸動脈血栓症、洞血栓症およびヴァレンベルク症候群）、脳内出血（例えば、硬膜外血腫もしくは硬膜下血腫、またはクモ膜下血腫）、脳梗塞、脳虚血（例えば、一過性脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群、または椎骨脳底不全（*vertebrobasilar insufficiency*））、血管性痴呆（例えば、多発脳梗塞性痴呆）、白質軟化症、脳室周囲および血管性頭痛（例えば、群発性頭痛または片頭痛）。

【 0 5 8 0 】

本発明のなおさらなる局面によれば、治療目的で、例えば神経学的細胞増殖および／または分化を刺激するために、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストを利用するためのプロセスが提供される。従って、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストは、神経学的疾患を処置、および／または検出するために用いられ得る。さらに、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、特定の神経系疾患または障害のマーカーまたは検出因子として用いられ得る。

【 0 5 8 1 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得る神経学的疾患の例としては、以下が挙げられる：脳疾患（例えば、母系フェニルケトン尿症のようなフェニルケトン尿症を含む代謝性脳疾患）、ビルビン酸カルボキシラーゼ欠乏症、ビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体欠乏症、ヴェルニッケ脳障害、脳水腫、テント下（*infratentorial*）新生物を含む小脳性新生物のような脳新生物、脈絡叢新生物のような脳室新生物、視床下部性新生物、テント上新生物、キャナヴァン病、毛細血管拡張性運動失調のような脊髄小脳性退化を含む小脳性運動失調のような小脳疾患、小脳性共同運動障害、フリードライヒ失調症、マチャド・ジョセフ病、オリブ橋小脳萎縮、テント下新生物のような小脳性新生物、びまん性軸周囲性脳炎、球様細胞白質萎縮症、異染性白質萎縮症および亜急性硬化性汎脳炎のようなびまん性脳硬化。

【 0 5 8 2 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：脳血管障害（例えば、頸動脈血栓症、頸動脈狭窄およびモヤモヤ病を含む頸動脈疾患）、脳のアミロイドアンギオパチー、大脳動脈瘤、脳無酸素症、大脳動脈硬化症、大脳動静脈奇形、大脳動脈疾患、脳塞栓症、ならびに頸動脈血栓症、洞血栓症およびヴァレンベルク症候群のような脳塞栓症および硬膜上血腫、硬膜下血腫およびクモ膜下出血のような脳出血、脳梗塞、一過性脳虚血のような脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群および椎骨脳底不全（*vertebrobasilar insufficiency*）、多発脳梗塞性痴呆のような血管性痴呆、脳室周囲白質軟化症、群発性頭痛および片頭痛のような血管性頭痛。

【 0 5 8 3 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては以下が挙げられる：エイズ痴呆複合症のような痴呆症、アルツハイマー病およびクロイツフェルト・ヤーコブ病のような初老期痴呆、アルツハイマー病および進行性核

上性麻痺のような老年痴呆、多発脳梗塞性痴呆のような血管性痴呆、びまん性軸周囲性脳炎を含む脳炎、流行性脳炎、日本脳炎、セントルイス脳炎、マダニ媒介性脳炎および西ナイル熱のようなウイルス性脳炎、急性播種性脳脊髄炎、ブドウ膜髄膜炎症候群、脳炎後パーキンソン病および亜急性硬化性汎脳炎のような髄膜脳脊髄炎、室周白斑症のような脳軟化症、小児痙攣を含む全身てんかんのようなてんかん、アブサンスてんかん (a b s e n c e e p i l e p s y) 、 M E R R F 症候群を含むミオクローヌステんかん、強直・間代てんかん、複雑部分てんかん、前頭葉てんかんおよび側頭葉てんかんのような部分てんかん、外傷後てんかん、持続性部分てんかんのようなてんかん重積持続状態およびハレルフォルデンーシュバッツ症候群。

【 0 5 8 4 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：ダンディーウォーカー症候群および正常圧水頭症のような水頭症、視床下部性新生物のような視床下部性疾患、大脳マラリア、脱力発作を含むナルコレプシー、延髄ポリオ (b u l b a r p o l i o m y e l i t i s) 、大脳偽腫瘍、レット症候群、ライ症候群、視床疾患、大脳トキシプラズマ症、頭蓋内結核腫およびツェルヴェーガー症候群、エイズ痴呆複合症のような中枢神経系感染、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、ウマの脳脊髄炎のような脳脊髄炎、ベネズエラウマ脳脊髄炎、壊死性出血性脳脊髄炎、ビスナ、ならびに大脳マラリア。

【 0 5 8 5 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：クモ膜炎のような髄膜炎、リンパ球性脈絡髄膜炎を含むウイルス性髄膜炎のような無菌性髄膜炎、ヘモフィルス髄膜炎を含む細菌性髄膜炎、リステリア髄膜炎、ウォーターハウズフリーデリックセン症候群のような髄膜炎菌性脳脊髄膜炎、肺炎球菌髄膜炎および髄膜結核症、クリプトコックス髄膜炎のような真菌性髄膜炎、硬膜下滲出、ブドウ膜髄膜脳炎症候群のような髄膜脳炎、横行脊髄炎 (t r a n s v e r s e m y e l i t i s) のような脊髄炎、脊髄ろ

うのような神経梅毒、延髄ポリオおよびポリオ後症候群を含むポリオ、プリオン病（例えば、クロイツフェルトーヤーコブ病、ウシの海綿状脳症、ゲルストマンーシュトロイスラー症候群、クールー、スクラピー）、ならびに大脳トキソプラズマ症。

【 0 5 8 6 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：テント下新生物のような小脳性新生物を含む脳新生物のような中枢神経系新生物、脈絡叢新生物、視床下部性新生物およびテント上新生物のような脳室新生物、髄膜新生物、硬膜外新生物を含む脊髄新生物、キャナヴァン病のような脱髄疾患、副腎脳白質ジストロフィーを含むびまん性大脳硬化症（*diffuse cerebral sclerosis*）、びまん性軸周囲性脳炎、球様細胞白質萎縮症、異染性白質萎縮症のようびまん性大脳硬化症、アレルギー性脳脊髄炎、壊死性出血性脳脊髄炎、進行性多病巣性白質脳障害、多発性硬化症、橋中央ミエリン溶解、横行脊髄炎、視神経脊髄炎、スクラピー、脊柱前弯症、慢性疲労症候群、ビスナ、高圧神経質症候群（*High Pressure Nervous Syndrome*）、髄膜炎、先天性筋無緊張症のような脊髄疾患、筋萎縮性側索硬化症、ヴェルドニッヒーホフマン病のような棘筋萎縮、脊髄圧搾、硬膜外新生物のような脊髄新生物、脊髄空洞症、脊髄ろう、スティッフマン症候群、母親由来15q-13微少欠損のような精神遅滞、ネコ鳴き症候群、ド・ランゲ症候群、ダウン症候群、ガングリオシドーシスG（M1）のようなガングリオシドーシス、ザントホフ病、テイーサックス病、ハートナップ病、ホモシスチン尿症、ローレンスームーンーピードル症候群、レッシューナイハン症候群、カエデシロップ病、フコース蓄積症のようなムコリビドーシス、ニューロンセロイド脂褐素沈着症、眼脳腎症候群、母系フェニルケトン尿のようなフェニルケトン尿症、ブラーダーヴィリ症候群、レット症候群、ルーピンスタインーテービ症候群、結節硬化症、WAGR症候群、全前脳症のような神経系異常、水無能症（*hydrangencephaly*）を含む無能症のような神経管不全、アルノルトーキアーリ奇形、脳ヘルニア、髄膜瘤、髄膜脊髄瘤、嚢胞性二分脊椎

および潜在性二分脊椎のような脊髄癒合不全。

【 0 5 8 7 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：シャルコーマリー疾患を含む遺伝性の運動および感覚ニューロン障害、遺伝性視覚萎縮症、レフスム病、遺伝性痙性対麻痺、ヴェルドニッヒーホフマン病、先天性痛覚脱失症および家族性自律神経障害のような遺伝性感覚および自律性ニューロパシー、神経学的症状発現（例えば、ゲルストマン症候群を含む失認）、逆向性健忘症のような健忘症、失行症、神経因性膀胱、脱力発作、難聴、部分聴覚欠失、大声（loudness）レクルートメントおよび耳鳴を含む聴覚障害のような情報伝達障害、失書症、名称失語症、プロカ失語症およびヴェルニッケ失語症を含む失語症のような言語障害、急性失読症のような失読症、言語発達障害、名称失語症、プロカ失語症およびヴェルニッケ失語症を含む失語症のような発語障害、構音障害、構語障害、反響言語、無言症およびどもりを含む発語障害のような情報伝達障害、失声症および嗄声のような発声障害、除脳硬直状態、せん妄、線維束性攣縮、幻覚、髄膜炎、母親由来15 q - 13 微小欠損、運動失調、アテトーシス、舞蹈病、失調症、運動低下症、筋肉緊張低下、ミオクロヌス、チック、斜頸および振せんのような運動障害、スティッフマン症候群のような筋肉硬直のような筋肉緊張亢進、筋肉痙性、耳帯状疱疹を含む顔面神経麻痺のような神経麻痺、胃不全麻痺、片麻痺、複視のような眼筋麻痺、デュエーン症候群、ホルナー症候群、キーンズ症候群のような慢性進行性外眼筋麻痺症、球麻痺、熱帯性痙攣不全対麻痺、ブラウナーセカール症候群、四肢麻痺、呼吸麻痺および声帯麻痺のような対麻痺、不全麻痺、幻肢、無味覚症および味覚不全のような味覚障害、弱視、失明、色覚異常、複視、半盲、視野暗点および準正常視覚（subnormal vision）のような視覚障害、クライネーレヴィン症候群、不眠症および夢遊症を含む過眠症のような睡眠障害、開口障害のような痙縮、昏睡、持続性植物状態および失神およびめまいのような意識消失、先天性筋無緊張症のような神経筋疾患、筋萎縮性側索硬化症、ランバートーイーソン筋無力症症候群、運動神経疾患、棘筋萎縮、シャルコーマリー疾患および

ヴェルドニッヒ-ホフマン病のような筋萎縮、後ポリオ症候群、筋ジストロフィー、重症筋無力症、萎縮性筋緊張症、先天性筋緊張症、ネマリンミオパシー、家族性期性四肢麻痺、多発性パラミクロローヌス (*M u l t i p l e x P a r a m y l o c l o n u s*)、熱帯性痙攣不全対麻痺およびスティッフマン症候群、先端肢端疼痛症のような末梢神経系疾患、アーディー症候群、*B a r r e - L i e o u* 症候群、家族性自律神経障害、ホルナー症候群、反射性交感神経性ジストロフィーおよびシャイードレーガー症候群のような自律神経系疾患、神経線維腫症2を含む聴神経腫のような内耳神経疾患のような脳神経疾患、顔面神経痛のような顔面神経疾患、メルカーソン-ローゼンタール症候群、弱視を含む眼球運動性障害、眼振、眼球運動麻痺、デュエーン症候群のような眼筋麻痺、ホルナー症候群、キーンズ症候群を含む慢性進行性外眼筋麻痺症、内斜視および外斜視のような斜視、動眼神経麻痺、遺伝性眼萎縮症を含む眼萎縮症のような眼神経疾患、視神経円板結晶腔、視神経脊髄炎のような視神経炎、乳頭水腫、三叉神経痛、声帯麻痺、視神経脊髄炎および脊柱前弯症のような脱髄疾患、糖尿病性足のような糖尿病性ニューロパシー。

【 0 5 8 8 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：手根管症候群のような神経圧搾症候群、足根管症候群、頸肋症候群のような胸郭出口症候群、尺骨神経圧搾症候群、カウザルギー、頸腕神経痛、顔面神経痛および三叉神経痛のような神経痛、実験的アレルギー性神経炎、眼神経炎、多発性神経炎、多発性神経根神経炎および神経根炎（例えば、多発性神経根炎、遺伝性運動および感覚ニューロパシー（例えば、シャルコー-マリエ疾患、遺伝性眼萎縮症、レフサム病、遺伝性痙攣性対麻痺およびヴェルドニッヒ-ホフマン病、遺伝性感覚および自律神経ニューロパシー（先天性痛覚脱失および、家族性自律神経障害を含む）、*P O E M S* 症候群、坐骨神経痛、味覚性発汗症候群およびテタニー））のような神経炎。

【 0 5 8 9 】

（感染性疾患）

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、感染因子を処置または検出するために用いられ得る。例えば、免疫応答を増加させることによって、特にB細胞および／またはT細胞の増殖および分化を増加させることによって、感染性疾患が処置され得る。免疫応答は、既存の免疫応答を増加させるか、または新たな免疫応答を開始させるかのいずれかにより上昇され得る。あるいは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストはまた、必ずしも免疫応答を誘発することなく、感染因子を直接阻害し得る。

【 0 5 9 0 】

ウイルスは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびに／あるいはアゴニストまたはアンタゴニストにより処置または検出され得る疾患または症状を引き起こし得る感染因子の一例である。ウイルスの例としては、以下のDNAおよびRNAのウイルスおよびウイルス科が挙げられるがこれらに限定されない：アルボウイルス、アデノウイルス科、アレナウイルス科、アルテリウイルス、ビルナウイルス科、ブニヤウイルス科、カルシウイルス科、サルコウイルス科 (C i r c o v i r i d a e)、コロナウイルス科、デング熱、EBV、HIV、フラビウイルス科、ヘパドナウイルス科 (肝炎)、ヘルペスウイルス科 (例えば、サイトメガロウイルス、単純ヘルペス、带状疱疹)、モノネガウイルス (M o n o n e g a v i r u s) (例えば、パラミクソウイルス科、麻疹ウイルス、ラブドウイルス科)、オルソミクソウイルス科 (例えば、インフルエンザA、インフルエンザB、およびパラインフルエンザ)、パピローマウイルス、パポバウイルス科、パルボウイルス科、ピコルナウイルス科、ポックスウイルス科 (例えば、痘瘡またはワクシニア)、レオウイルス科 (例えば、ロタウイルス)、レトロウイルス科 (HTLV-I、HTLV-II、レンチウイルス)、およびトガウイルス科 (例えば、ルビウイルス属)。これらの科内に入るウイルスは、以下を含むがこれらに限定されない種々の疾患または症状を引き起こし得る：関節炎、細気管支炎 (b r o n c h i o l l i t i s)、RSウイルス、脳炎、眼感染症 (例えば、結膜炎、角膜炎)、慢性疲労症候群、肝炎 (A型、B型、C型、E型、慢性活動性、デルタ)、日本脳炎、フニン、チングニア、リフトバレー熱

、黄熱病、髄膜炎、日和見感染症（例えば、A I D S）、肺炎、パーキットリンバ腫、水痘、出血熱、麻疹、流行性耳下腺炎、パラインフルエンザ、狂犬病、感冒、ポリオ、白血病、風疹、性感染症、皮膚病（例えば、カポジ、いぼ）、およびウイルス血症。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状または疾患が処置または検出され得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、以下の処置に使用される：髄膜炎、デング熱、E B V、および／または肝炎（例えば、B型肝炎）。さらなる特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、1以上の他の市販の肝炎ワクチンに非応答性の患者を処置するために使用される。さらに特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、A I D Sを処置するために使用される。

【 0 5 9 1 】

同様に、疾患または症状を引き起こし得、かつ本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびに／またはアゴニストまたはアンタゴニストによって処置または検出され得る細菌性因子あるいは真菌性因子は、以下のグラム陰性およびグラム陽性の細菌、細菌科ならびに真菌を含むがこれらに限定されない：放線菌属（例えば、*Norcardia*）、アシネトバクター属、*Cryptococcus neoformans*、アスペルギルス属、バチルス属（例えば、*Bacillus anthracis*）、バクテロイデス属、（例えば、*Bacteroides fragilis*）、プラストミセス症、ボルデテラ属、ボレリア属（例えば、*Borrelia burgdorferi*）、ブルセラ属、カンジダ属（*Candida*）、カンピロバクター属、クラミジア属、クロストリジウム属（例えば、*Clostridium botulinum*、*Clostridium difficile*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium tetani*）、コクシジオイデス属、コリネバクテリウム属（例えば、*Corynebacterium diphtheriae*）、クリプトコックス属、*Dermatocycoses*、*E. c*

o l i (例えば、腸毒性大腸菌および腸出血性大腸菌)、エンテロバクター属 (例えば、*Enterobacter aerogenes*)、腸内細菌科 (クレブシエラ属、サルモネラ属 (例えば、*Salmonella typhi*、*Salmonella enteritidis*、*Salmonella typhi*)、セラチア属、エルジニア属、赤痢菌属)、エリジペロスリックス属、ヘモフィルス属 (例えば、*Haemophilus influenza B*型)、ヘリコバクター属、レジオネラ属 (例えば、*Legionella pneumophila*)、レプトスピラ属、リステリア属 (例えば、*Listeria monocytogenes*)、マイコプラズマ属、マイコバクテリウム属 (例えば、*Mycobacterium leprae*および*Mycobacterium tuberculosis*)、ブブリオ属 (例えば、*Vibrio cholerae*)、ナイゼリア属 (*Neisseriaceae*) (例えば、*Neisseria gonorrhea*、*Neisseria meningitidis*)、パスツレラ属、プロテウス属、シュードモナス属 (例えば、*Pseudomonas aeruginosa*)、リケッチア属、スピロヘータ属 (*Spirochetes*) (例えば、トレポネーマ属種、レプトスピラ属種、ボレリア属種)、赤痢菌種、ブドウ球菌属 (例えば、*Streptococcus aureus*)、*Meningiocooccus*、肺炎球菌、および連鎖球菌属 (例えば、*Streptococcus pneumoniae*およびA、BおよびC群連鎖球菌) およびウレアプラスマ属。これらの細菌科、寄生虫科、および真菌科は、以下に挙げる疾患または症状を引き起こし得るが、限定ではない：抗生物質耐性感染症、菌血症、心内膜炎、敗血症、眼感染 (例えば、結膜炎)、ブドウ膜炎、結核、歯肉炎、細菌性下痢、日和見感染 (例えば、AIDS 関連感染)、爪囲炎、プロテアーゼ関連感染、う食、ライター病、気道感染、(例えば、百日咳または蓄膿)、敗血症、ライム病、ネコ引っ掻き病、赤痢、パラチフス熱、食中毒、レジオネラ症、慢性炎症および急性炎症、紅斑、酵母感染、腸チフス、肺炎、淋病、髄膜炎 (例えば、髄膜炎 (髄膜炎 (*meningitis*) A型およびB型))、クラミジア、梅毒、ジフテリア、らい病、ブルセラ症、消化性潰瘍、炭疽、自然流産、出生時欠損、肺炎、肺感染、耳感染、難聴、盲、嗜眠

、倦怠、嘔吐、慢性下痢、クローン病、大腸炎、膣の病気、生殖不能、骨盤炎症疾患 (*pelvic inflammatory disease*)、カンジダ症、パラ結核、結核、狼瘡、ポツリヌス中毒、壊疽、破傷風、膿痂疹、リウマチ熱、猩紅熱、性感染症、皮膚疾患 (例えば、蜂巣炎、*dermatocycoses*)、毒血症、尿路感染症、創傷感染、*nosocomial* 感染。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストを使用してこれらのうちの任意の症状または疾患を処置または検出し得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストを使用して、以下を処置し得る：破傷風、ジフテリア、ポツリヌス中毒、および／または B 型髄膜炎。

【 0 5 9 2 】

さらに、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストにより処置、予防および／または診断され得る、寄生生物性因子が引き起こす疾患または症状としては以下の科またはクラスが挙げられるがこれらに限定されない：アメーバ症、バベシア症、コクシジウム症、クリプトスポリジウム症、二核アメーバ症 (*Dientamoebiasis*)、交疫、外部寄生生物性 (*Ectoparasitic*)、ジアルジア鞭毛虫症、蟯虫症、リーシュマニア症、住血吸虫属 (*Schistisoma*) タイレリア症、トキソプラズマ症、トリパノソーマ症、およびトリコモナス (*Trichomonas*) 症、ならびに胞子虫症 (*Sporozoan*) (例えば、*Plasmodium virax*、*Plasmodium falciparium*、*Plasmodium malariae* および *Plasmodium ovale*)。これらの寄生生物は、以下を含むがこれらに限定されない種々の疾患または症状を引き起こし得る：疥癬、ツツガムシ病、眼感染症、腸疾患 (例えば、赤痢、ジアルジア鞭毛虫症)、肝臓疾患、肺疾患、日和見感染症 (例えば、AIDS 関連)、マラリア、妊娠合併症、およびトキソプラズマ症。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状または疾患を処置、予防または診断し得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴ

ニストもしくはアンタゴニストは、マラリアを処置、予防、および／または診断するために用いられる。

【0593】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、患者に有効量のポリペプチドを投与するか、または患者から細胞を取り出して、本発明のポリヌクレオチドをこの細胞に供給し、そして操作した細胞を患者に戻す（エキソビボ治療）かのいずれかによるものであり得る。さらに、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドはワクチン中の抗原として用いられて、感染性疾患に対する免疫応答を惹起し得る。

【0594】

（再生）

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、細胞を分化させ、増殖させ、そして誘引して、組織の再生を導き得る（Science 276:59-87（1997）を参照のこと）。組織の再生を用いて、先天性欠損、外傷（創傷、熱傷、切開、または潰瘍）、加齢、疾患（例えば、骨粗鬆症、変形性関節症（osteoarthritis）、歯周病、肝不全）、美容形成手術を含む手術、線維症、再灌流傷害、もしくは全身性サイトカイン損傷により損傷を受けた組織を修復、置換、または保護し得る。

【0595】

本発明を用いて再生し得る組織としては、以下が挙げられる：器官（例えば、脾臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、内皮）、筋肉（平滑筋、骨格筋、または心筋）、血管系（血管およびリンパ管を含む）、神経、造血、および骨格（骨、軟骨、腱、および靱帯）の組織。好ましくは、再生は、瘢痕なく、または瘢痕が低減されて生じる。再生はまた、新脈管形成を含み得る。

【0596】

さらに、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、治癒するのが困難な組織の再生を増加させ得る。例えば、腱／靱帯の再生を増大させることによって、損傷後の回復時間が早まる

。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、損傷を回避する試みにおいて予防的に使用され得る。処置され得る特定の疾患は、腱炎、手根管症候群、および他の腱欠損または靱帯欠損を含む。非治癒創傷の組織再生のさらなる例としては、褥瘡性潰瘍（pressure ulcer）、脈管不全、外科的創傷、および外傷性創傷に関連する潰瘍が挙げられる。

【 0 5 9 7 】

同様に、神経および脳組織はまた、神経細胞を増殖および分化させるために本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストを使用することによって再生され得る。本方法を用いて処置され得る疾患としては、中枢神経系疾患および末梢神経系疾患、神経障害、または機械的および外傷性障害（例えば、脊髄障害、頭部外傷、脳血管疾患、および発作（stroke））が挙げられる。詳細には、末梢神経傷害と関連する疾患、末梢神経障害（例えば、化学療法または他の医学的療法から生じる）、局在神経障害、および中枢神経系疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンティングトン病、筋萎縮性側索硬化症、およびシャイードレーガー症候群）はすべて、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置され得る。

【 0 5 9 8 】

（走化性）

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、走化性活性を有し得る。走化性分子は、細胞（例えば、単球、線維芽細胞、好中球、T細胞、肥満細胞、好酸球、上皮細胞および／または内皮細胞）を、身体内の特定の部位（例えば、炎症、感染、または過剰増殖の部位）に誘引または動員する。次いで、動員された細胞は、特定の外傷または異常性を撃退および／または治癒し得る。

【 0 5 9 9 】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、特定の細胞の走化性活性を増大し得る。次いで、これらの

走化性分子を使用して、身体内の特定の位置に標的化した細胞の数を増加させることによって、炎症、感染、過増殖障害、または任意の免疫系障害を処置し得る。例えば、走化性分子を使用して、傷害を受けた位置に免疫細胞を誘引することによって、組織に対する創傷および他の外傷を処置し得る。本発明の走化性分子はまた、線維芽細胞を誘引し得、これは創傷を処置するために使用され得る。

【 0 6 0 0 】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストが走化性活性を阻害し得ることもまた意図される。これらの分子はまた、障害を処置するために使用され得る。従って、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、走化性のインヒビターとして使用され得る。

【 0 6 0 1 】

(結合活性)

本発明のポリペプチドは、このポリペプチドに結合する分子、またはこのポリペプチドが結合する分子についてスクリーニングするために使用され得る。このポリペプチドとこの分子との結合は、結合したポリペプチドまたは分子の活性を活性化（アゴニスト）、増大、阻害（アンタゴニスト）、または減少させ得る。そのような分子の例としては、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質（例えば、レセプター）、または低分子が挙げられる。

【 0 6 0 2 】

好ましくは、この分子は、このポリペプチドの天然のリガンド（例えば、リガンドのフラグメント）、または天然の基質、リガンド、構造的模倣物、もしくは機能的模倣物に密接に関連する（Coliganら、Current Protocols in Immunology 1 (2) : 第5章 (1991) を参照のこと）。同様に、この分子は、このポリペプチドが結合する天然のレセプター、または少なくとも、このポリペプチドによって結合され得るレセプターのフラグメント（例えば、活性部位）に密接に関連し得る。いずれの場合においても、この分子は、公知の技術を用いて合理的に設計され得る。

【 0 6 0 3 】

好ましくは、これらの分子についてのスクリーニングは、このポリペプチドを発現する適切な細胞を産生する工程を包含する。好ましい細胞としては、哺乳動物、酵母、*Drosophila*、または*E. coli*由来の細胞が挙げられる。次いで、このポリペプチドを発現する細胞（または、発現されたポリペプチドを含む細胞膜）を、好ましくは、このポリペプチドまたはこの分子のいずれかの結合、活性の刺激、または活性の阻害を観察するための分子を潜在的に含む試験化合物と接触させる。

【0604】

このアッセイは、このポリペプチドへの候補化合物の結合を単純に試験し得、ここで結合は、標識によって、または標識された競合物との競合に関するアッセイにおいて検出される。さらに、アッセイは、候補化合物がこのポリペプチドへの結合によって生成されるシグナルを生じるか否かを試験し得る。

【0605】

あるいは、このアッセイは、無細胞調製物、固体支持体に接着されたポリペプチド／分子、化学ライブラリー、または天然産物の混合物を用いて実施され得る。アッセイはまた、候補化合物を、ポリペプチドを含む溶液と混合する工程、ポリペプチド／分子の活性または結合を測定する工程、およびポリペプチド／分子の活性または結合を、標準と比較する工程を単純に包含し得る。

【0606】

好ましくは、ELISAアッセイは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いて、サンプル（例えば、生物学的サンプル）におけるポリペプチドのレベルまたは活性を測定し得る。抗体は、ポリペプチドへの直接的もしくは間接的のいずれかの結合、または基質についてのポリペプチドとの競合によって、ポリペプチドのレベルまたは活性を測定し得る。

【0607】

さらに、本発明のポリペプチドが結合するレセプターは、当業者に公知の多くの方法（例えば、リガンドバニングおよびFACSソーティング（*Coliganら、Current Protocols in Immun.*, 1(2)、第5章(1991)））によって同定され得る。例えば、ポリアデニル化RNA

がこのポリペプチドに応答する細胞から調製される発現クローニングが用いられ、例えば、NIH3T3細胞（これは、FGFファミリータンパク質に対する複数のレセプターを含むことが公知である）、およびSC-3細胞、およびこのRNAから作製されたcDNAライブラリーは、プールに分けられ、そしてこのポリペプチドに応答性でないCOS細胞または他の細胞をトランスフェクトするために使用される。ガラススライド上で増殖しているトランスフェクトされた細胞は、それらを標識化した後に、本発明のポリペプチドに曝露される。このポリペプチドは、種々の手段（部位特異的プロテインキナーゼに対する認識部位のヨウ素化または封入を含む）によって標識化され得る。

【 0 6 0 8 】

固定化およびインキュベーション後、スライドは、オートラジオグラフィー分析に供される。陽性プールを同定し、そしてサブプールを、反復性のサブプール化および再スクリーニングプロセスを使用して調製および再びトランスフェクトして、最終的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生じる。

【 0 6 0 9 】

レセプター同定のための代替のアプローチとして、標識ポリペプチドは、レセプター分子を発現する調製物を、細胞膜と光親和性に連結し得るか、または抽出し得る。架橋された材料は、PAGE分析によって分離され、そしてX線フィルムに曝露される。ポリペプチドのレセプターを含む標識複合体が切り出され得、ペプチドフラグメントへと分離され得、そしてタンパク質微小配列決定に供され得る。微小配列決定から得られるアミノ酸配列を使用して、1組の縮重オリゴヌクレオチドプローブを設計してcDNAライブラリーをスクリーニングし、推定レセプターをコードする遺伝子を同定する。

【 0 6 1 0 】

さらに、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリング、および／またはコドンシャッフリングの技術（集合的に「DNAシャッフリング」という）を利用して、本発明のポリペプチドの活性を調節し得、それによって本発明のポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを効果的に生成する。一般に、米国特許第5,605,793号、同第5,811,238号

、同第5, 830, 721号、同第5, 834, 252号、および同第5, 837, 458号、ならびにPatten, P. A. ら、Curr. Opinion Biotechnol. 8: 724~33 (1997); Harayama, S. Trends Biotechnol. 16 (2): 76~82 (1998); Hansson, L. O. ら、J. Mol. Biol. 287: 265~76 (1999); ならびにLorenzo, M. M. およびBlasco, R. Biotechniques 24 (2): 308~13 (1998) (これらの特許および刊行物の各々は、本明細書において参考として援用される) を参照のこと。1つの実施形態において、ポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドの変更は、DNAシャッフリングによって達成され得る。DNAシャッフリングは、相同組換えまたは部位特異的な組換えによる、2つ以上のDNAセグメントの、所望の分子へのアセンブリを含む。別の実施形態において、ポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドは、組換えの前に、誤りがちな (error-prone) PCR、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法によるランダム変異誘発に供することによって、変更され得る。別の実施形態において、本発明のポリペプチドの1つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメントなどは、1つ以上の異種分子の1つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメントなどと組換えられ得る。好ましい実施形態において、この異種分子は、ファミリーのメンバーである。さらに好ましい実施形態において、この異種分子は、例えば、血小板由来増殖因子 (PDGF)、インスリン様増殖因子 (IGF-I)、トランスホーミング増殖因子 (TGF)- α 、上皮増殖因子 (EGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、TGF- β 、骨形態形成タンパク質 (BMP)-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、アクチピンAおよびアクチピンB、デカペンタプレジック (decapentaplegic) (dpp)、60A、OP-2、ドーサリン (dorsalin)、増殖分化因子 (GDF)、結節 (nodal)、MIS、インヒピン- α 、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 5、および神経膠由来神経栄養因子 (GDNF) のような増殖因子である。

【0611】

他の好ましいフラグメントは、生物学的に活性な本発明のポリペプチドフラグメントである。生物学的に活性なフラグメントは、本発明のポリペプチドの活性に類似の活性を示すが、必ずしも同一ではないフラグメントである。このフラグメントの生物学的活性は、改善された所望の活性、または減少した所望されない活性を含み得る。

【 0 6 1 2 】

さらに、本発明は、本発明のポリペプチドの作用を調節する化合物を同定するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。このようなアッセイの例は、哺乳動物線維芽細胞、本発明のポリペプチド、スクリーニングされるべき化合物および³ [H] チミジンを、線維芽細胞が通常増殖する細胞培養条件下で組み合わせる工程を包含する。コントロールアッセイは、スクリーニングされるべき化合物の非存在下で実施され得、そしてこの化合物の存在下での線維芽細胞の増殖の量と比較して、各々の場合における³ [H] チミジンの取り込みの決定によって、この化合物が増殖を刺激するか否かを決定し得る。線維芽細胞の増殖の量は、³ [H] チミジンの取り込みを測定する液体シンチレーションクロマトグラフィによって測定される。アゴニスト化合物およびアンタゴニスト化合物の両方が、この手順により同定され得る。

【 0 6 1 3 】

別の方法において、本発明のポリペプチドに対するレセプターを発現する哺乳動物細胞または膜調製物は、この化合物の存在下において標識化した本発明のポリペプチドとともにインキュベートされる。次いで、この化合物がこの相互作用を増強またはブロックする能力が、測定され得る。あるいは、スクリーニングされるべき化合物の相互作用に従う既知のセカンドメッセンジャー系の応答およびレセプターが測定され、そしてこの化合物がこのレセプターに結合し、そしてセカンドメッセンジャー応答を誘発する能力を測定して、この化合物が潜在的なアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを決定する。このようなセカンドメッセンジャー系には、cAMP グアニル酸シクラーゼ、イオンチャネルまたはホスホイノシチド加水分解が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 6 1 4 】

これらの上記のアッセイの全ては、診断マーカーまたは予後マーカーとして使用され得る。これらのアッセイを用いて発見される分子は、ポリペプチド／分子を活性化または阻害することによって、疾患を処置するか、または患者における特定の結果（例えば、血管増殖）をもたらすために使用され得る。さらに、アッセイは、適切に操作された細胞または組織からの本発明のポリペプチドの産生を阻害または増強し得る因子を発見し得る。

【 0 6 1 5 】

従って、本発明は、以下の工程を含む本発明のポリペプチドに結合する化合物を同定する方法を包含する：（a）候補結合化合物を本発明のポリペプチドとともにインキュベートする工程；および（b）結合が生じたか否かを決定する工程。さらに、本発明は、以下の工程を含むアゴニスト／アンタゴニストを同定する方法を包含する：（a）候補化合物を本発明のポリペプチドとともにインキュベートする工程、（b）生物学的活性をアッセイする工程、および（b）ポリペプチドの生物学的活性が改変されているか否かを決定する工程。

【 0 6 1 6 】

（標的化された送達）

別の実施形態において、本発明は、組成物を、本発明のポリペプチドについてのレセプターを発現する標的化細胞、または本発明のポリペプチドの細胞結合形態を発現する細胞に送達する方法を提供する。

【 0 6 1 7 】

本明細書中で議論される場合、本発明のポリペプチドまたは抗体は、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素またはプロドラッグと、疎水性、親水性、イオン性および／または共有結合性の相互作用を介して会合し得る。1つの実施形態において、本発明は、異種ポリペプチドまたは核酸と会合した本発明のポリペプチド（抗体を含む）を投与することによる、本発明の組成物の細胞への特異的な送達のための方法を提供する。1つの例において、本発明は、治療タンパク質を標的化細胞中へ送達するための方法を提供する。別の例において、本発明は、一本鎖核酸（例えば、アンチセンスまたはリボザイム）あるいは二本鎖核酸（例えば、細胞のゲノムに組み込まれ得るか、またはエピソードにて複製し得、そして転写さ

れ得る、DNA)を、標的化細胞に送達するための方法を提供する。

【0618】

別の実施形態において、本発明は、毒素または細胞傷害性プロドラッグと会合した本発明のポリペプチド（例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明の抗体）を投与することによる細胞の特異的破壊（例えば、腫瘍細胞の破壊）のための方法を提供する。

【0619】

「毒素」とは、内因性の細胞傷害性エフェクター系、放射性同位体、ホロ毒素（holotoxin）、改変型毒素、毒素の触媒サブユニット、または規定の条件下で細胞死を引き起こす細胞中もしくは細胞表面には通常存在しない任意の分子もしくは酵素を、結合および活性化する化合物を意味する。本発明の方法に従って使用され得る毒素としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：当該分野で公知の放射性同位体、固有のまたは誘導された内因性の細胞傷害性エフェクター系を結合する化合物（例えば、抗体（またはその補体固定を含む部分））、チミジンキナーゼ、エンドヌクレアーゼ、RNAse、 α 毒素、リシン、アブリン、Pseudomonas外毒素A、ジフテリア毒素、サボリン、モモルジン（momordin）、ゲロニン（gelonin）、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、 α -サルシン（sarcin）およびコレラ毒素。

「細胞傷害性プロドラッグ」とは、通常細胞内に存在する酵素によって、細胞傷害性化合物へと変換される非毒性の化合物を意味する。本発明の方法に従って使用され得る細胞傷害性プロドラッグとしては、安息香酸マスタードアルキル化剤のグルタミル誘導体、エトポシドまたはマイトマイシンCのリン酸誘導体、シトシンアラビノシド、ダウノルビシン、およびドキソルビシンのフェノキシアセトアミド誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0620】

（薬物スクリーニング）

本発明のポリペプチドの活性を改変する分子についてスクリーニングするための、本発明のポリペプチド、またはこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用が、さらに意図される。このような方法は、本発明のポリペプチ

ドを、アンタゴニスト活性またはアゴニスト活性を有することが疑われる選択された化合物と接触させる工程、および結合に続いてこれらのポリペプチドの活性をアッセイする工程を包含する。

【 0 6 2 1 】

本発明は、種々の薬物スクリーニング技術のいずれかにおいて、本発明のポリペプチド、またはそれらの結合フラグメントを使用することによって治療用化合物をスクリーニングするために特に有用である。このような試験に用いられるポリペプチドまたはフラグメントは、固体支持体に固定化され得、細胞表面上に発現され得、溶液中で遊離であり得、または細胞内に局在化され得る。薬物スクリーニングの1つの方法は、ポリペプチドまたはフラグメントを発現する組換え核酸を用いて安定に形質転換される真核生物宿主細胞または原核生物宿主細胞を利用する。薬物は、競合結合アッセイにおいて、このような形質転換細胞に対してスクリーニングされる。例えば、試験されている薬剤と本発明のポリペプチドとの間の複合体の形成 (f o r m u l a t i o n) を測定し得る。

【 0 6 2 2 】

従って、本発明は、本発明のポリペプチドによって媒介される活性に影響を及ぼす薬物または任意の他の薬剤についてのスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、当該分野で周知の方法によって、このような薬剤を本発明のポリペプチドもしくはそのフラグメントと接触させる工程、およびこの薬剤とこのポリペプチドもしくはそのフラグメントとの間の複合体の存在についてアッセイする工程を包含する。このような競合結合アッセイにおいて、スクリーニングされる薬剤は、代表的に、標識化される。インキュベーション後に、遊離の薬剤は、結合形態で存在する薬剤から分離され、そして遊離または複合体化されていない標識の量は、特定の薬剤が本発明のポリペプチドに結合する能力の尺度である。

【 0 6 2 3 】

薬物スクリーニングについての別の技術は、本発明のポリペプチドに対する適切な結合親和性を有する化合物に対するハイスループットスクリーニングを提供し、そして欧州特許出願 8 4 / 0 3 5 6 4 (1 9 8 4 年 9 月 1 3 日 公 開) (これは、本明細書中で参考として援用される) に非常に詳細に記載される。簡潔にい

うと、大量の異なる小さなペプチド試験化合物は、固体基材（例えば、プラスチックピンまたは何らかの他の表面）上で合成される。ペプチド試験化合物を、本発明のポリペプチドと反応させ、そして洗浄する。次いで、結合したポリペプチドは、当該分野で周知の方法によって検出される。精製されたポリペプチドは、前述の薬物スクリーニング技術での使用のためにプレート上に直接コーティングされる。さらに、非中和抗体を使用して、このペプチドを捕捉し得、そして固体支持体上にそれを固定し得る。

【 0 6 2 4 】

本発明はまた、競合薬物スクリーニングアッセイの使用を意図し、ここで、本発明のポリペプチドを結合し得る中和抗体は、ポリペプチドまたはそのフラグメントに対する結合について試験化合物と特異的に競合する。この様式において、抗体を使用して、本発明のポリペプチドと1つ以上の抗原性エピトープを共有する任意のペプチドの存在を検出する。

【 0 6 2 5 】

（アンチセンスおよびリボザイム（アンタゴニスト））

特定の実施形態において、本発明に従うアンタゴニストは、配列番号Xに含まれる配列もしくはその相補鎖に対応する核酸、および／または表1において同定されるcDNAプラスミドVに含まれるヌクレオチド配列に対応する核酸である。1つの実施形態において、アンチセンス配列は、生物体により内部で生成され、別の実施形態において、アンチセンス配列は、別々に投与される（例えば、O'Connor, J., Neurochem. 56:560 (1991) を参照のこと）。Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)。アンチセンス技術を使用して、アンチセンスDNAもしくはRNAを通してか、または3重らせんの形成を通して遺伝子発現を制御し得る。アンチセンス技術は、例えば、Okano, J. Neurochem. 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca

Raton, FL (1988) で議論される。3重らせん形成は、例えば、Leeら、Nucleic Acids Research 6:3073 (1979); Cooneyら、Science 241:456 (1988); および Dervanら、Science、251:1300 (1991) において議論される。これらの方法は、相補的なDNAまたはRNAへのポリヌクレオチドの結合に基づく。

【0626】

例えば、非リンバ球性白血病細胞株であるHL-60および他の細胞株の増殖を阻害するためのc-mycおよびc-mybアンチセンスRNA構築物の使用は、以前に記載された(Wickstromら(1988); Anfossiら(1989))。これらの実験は、このオリゴヌクレオチドとともに細胞をインキュベートすることによりインビトロで行われた。インビボでの使用のための同様の手順は、WO91/15580に記載されている。簡潔には、所定のアンチセンスRNAについての1対のポリヌクレオチドを以下のように生成する：オープンリーディングフレームの最初の15塩基に相補的な配列を、5末端部位上のEcoRI部位および3末端のHindIII部位に隣接させる。次に、この対のオリゴヌクレオチドを90℃で1分間加熱し、次いで、2×連結緩衝液(20 mM TRIS HCl pH7.5、10 mM MgCl₂、10 mM ジチオスレイトール(DTT)および0.2 mM ATP)中でアニールし、次いで、レトロウイルスベクターPMV7(WO91/15580)のEcoRI/HindIII部位に連結する。

【0627】

例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの5'コード部分を使用して、約10~40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計し得る。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に関与する遺伝子の領域に相補的であるように設計され、それにより転写およびレセプターの産生を阻害する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、インビボでmRNAにハイブリダイズし、そしてmRNA分子のレセプターポリペプチドへの翻訳をブロックする。

【 0 6 2 8 】

1つの実施形態において、本発明のアンチセンス核酸は、外来の配列からの転写により細胞内で産生される。例えば、ベクターまたはその一部が転写され、本発明のアンチセンス核酸（RNA）を産生する。このようなベクターは、アンチセンス核酸をコードする配列を含む。このようなベクターは、それが転写されて所望のアンチセンスRNAを産生し得る限り、エピソードのベクターのままであるか、または染色体に組込まれ得る。このようなベクターは、当該分野において標準的な組換えDNA技術方法により構築され得る。ベクターは、脊椎動物細胞において複製および発現のために使用される、当該分野で公知のプラスミド、ウイルスなどであり得る。本発明のポリペプチドをコードする配列またはそのフラグメントの発現は、脊椎動物、好ましくはヒト細胞において作用する、当該分野で公知の任意のプロモーターにより得る。そのようなプロモーターは、誘導性または構成的であり得る。このようなプロモーターとしては、SV40初期プロモーター領域（Bernois tおよびChambon、Nature、29：304-310（1981））、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれるプロモーター（Yamamotoら、Cell、22：787-797（1980））、ヘルペスチミジンプロモーター（Wagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78：1441-1445（1981））、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinsterら、Nature、296：39-42（1982））などが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 6 2 9 】

本発明のアンチセンス核酸は、本発明の遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部に相補的な配列を含む。しかし、完全に相補的であることは好ましいが、必ずしも必要ではない。本明細書中で言及される「少なくともRNAの一部に相補的な」配列は、RNAとハイブリダイズし得るに十分な相補性を有し、安定な二重鎖を形成する配列を意味し；従って、二本鎖アンチセンス核酸の場合において、二重鎖DNAの一本鎖が試験され得るか、または三重鎖形成がアッセイされ得る。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセンス核酸の長さの両方に依存する。一般的に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、RNAとのより

多くの塩基ミスマッチを含み得、これは、安定な二重鎖（または三重鎖の場合もあり得る）を含み得、そしてなお形成し得る。当業者は、ハイブリダイズ複合体の融点を決定するために標準的な手順を使用することによりミスマッチの許容の程度を確認し得る。

【 0 6 3 0 】

メッセージの5'末端に相補的であるオリゴヌクレオチド（例えば、AUG開始コドンまででかつAUG開始コドンを含む5'非翻訳配列）は、翻訳の阻害の際に最も効率的に働くべきである。しかし、mRNAの3'非翻訳配列に相補的な配列は、同様にmRNAの翻訳を阻害する際に有効であることが示された。一般的に、Wagner, R., 1994, Nature 372: 333-335を参照のこと。従って本明細書に記載のポリヌクレオチド配列の5'-もしくは3'-の非翻訳、非コード領域のいずれかに相補的なオリゴヌクレオチドは、内因性mRNAの翻訳を阻害するアンチセンスアプローチに使用され得る。mRNAの5'非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、AUG開始コドンの相補物を含むべきである。mRNAコード領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、翻訳のあまり効率的でないインヒビターであるが、本発明に従って使用され得る。本発明のmRNAの5'領域、3'領域またはコード領域にハイブリダイズするように設計されるか否かにかかわらず、アンチセンス核酸は、少なくとも6ヌクレオチド長であるべきであり、そして好ましくは6～約50ヌクレオチド長にわたるオリゴヌクレオチドである。特定の局面において、このオリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチドまたは少なくとも50ヌクレオチドである。

【 0 6 3 1 】

本発明のポリヌクレオチドは、DNA、もしくはRNA、またはキメラ混合物、あるいはそれらの誘導体もしくは改変バージョン、一本鎖、または二本鎖であり得る。このオリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格において改変され、例えば、分子の安定性、ハイブリダーゼーションなどを改善し得る。このオリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付加基（例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的化するために）、または細胞膜を通した輸送を促

進する因子（例えば、L e t s i n g e r ら、1989、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 86:6553-6556; L e m a i t r e ら、1987、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 84:648-652; P C T 公開番号 W O 88/09810 (1988年12月15日公開) を参照のこと)、または血液脳関門（例えば、P C T 公開番号 W O 89/10134 (1988年4月25日公開) を参照のこと)、ハイブリダイゼーション誘引切断剤 (h y b r i d i z a t i o n - t r i g g e r e d c l e a v a g e a g e n t) (例えば、K r o l ら、1988、B i o T e c h n i q u e s , 6:958-976 を参照のこと)、またはインターカレート剤（例えば、Z o n , 1988、P h a r m . R e s . 5:539-549 を参照のこと) を含み得る。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダーゼーション誘引架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘引切断剤など) に結合体化され得る。

【0632】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの改変された塩基部分を含み得、この塩基部分は、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される：
 5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β -D-ガラクトシルキューオシン (g a l a c t o s y l q u e o s i n e)、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸 (v)、ワイブトキソシン (w y b u t o x o s i n e)、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-

メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2,6-ジアミノプリン。

【0633】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される少なくとも1つの改変された糖部分を含み得る：アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソース。

【0634】

さらなる別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される少なくとも1つの改変されたリン酸骨格を含む：ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミドチオエート、ホスホロアミデート(phosphoramidate)、ホスホロジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、およびホルムアセタール(formacetal)またはそれらのアナログ。

【0635】

さらなる別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、a-アノマーオリゴヌクレオチドである。a-アノマーオリゴヌクレオチドは、相補的なRNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成し、通常のb-ユニットとは反対に、その鎖は互いに平行にする(Gautierら、1987、Nuc l. A c i d s R e s.、15:6625-6641)。このオリゴヌクレオチドは、2'-O-メチルリボヌクレオチドであるか(Inoueら、1987、Nuc l. A c i d s R e s.、15:6131-6148)、またはキメラRNA-DNAアナログである(Inoueら、1987、FEBS L e t t. 215:327-330)。

【0636】

本発明のポリヌクレオチドは当該分野で公知の標準的な方法(例えば、自動DNA合成機により(このような装置はBiosearch, Applied B

i o s y s t e m s などから市販されている)の使用により)合成され得る。例えば、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Steinらの方法(1988、Nucl. Acids Res. 16:3209)により合成され得、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、制御された細孔ガラス(controlled pore glass)ポリマー支持体(Sarinら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:7448-7451)の使用などにより調製され得る。

【0637】

コード領域配列に相補的なアンチセンスヌクレオチドが、使用され得るが、転写された非翻訳領域に相補的なアンチセンスヌクレオチドが最も好ましい。

【0638】

本発明による潜在的なアンタゴニストはまた、触媒RNA、すなわちリボザイムを含む(例えば、PCT国際公開WO90/11364、1990年10月4日公開; Sarverら、Science、247:1222-1225(1990)を参照のこと)。一方、部位特異的認識配列でmRNAを切断するリボザイムを使用して、mRNAを破壊し得るが、ハンマーヘッド型リボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッド型リボザイムは、標的mRNAと相補的な塩基対を形成する隣接領域により決定される位置で、mRNAを切断する。たった1つの必要条件是、標的mRNAが以下の2つの塩基の配列を有することである: 5'-UG-3'。ハンマーヘッド型リボザイムの構築および生成は当該分野で周知であり、そしてHaseloffおよびGerlach、Nature、334:585-591(1988)に、より十分に記載される。配列番号Xのヌクレオチド配列内に多くの潜在的なハンマーヘッド型リボザイム切断部位が存在する(図1A~B)。好ましくは、このリボザイムは、切断認識部位がmRNAの5'末端付近に位置するように; すなわち、効率を増大し、そして非機能的mRNA転写物の細胞内蓄積を最小化するように、操作される。

【0639】

アンチセンスアプローチの場合、本発明のリボザイムは、改変されたオリゴヌクレオチド(例えば、安定性、標的化などについて改良された)から構成され得

、そしてインビボにおいて本発明のポリペプチドを発現する細胞に送達されるべきである。リボザイムをコードするDNA構築物は、DNAをコードするアンチセンスの導入のための上記と同じ様式で細胞中に導入され得る。送達の好ましい方法は、強力な構成的プロモーター（例えば、p o l I I Iまたはp l I Iプロモーターのような）の制御下でリボザイムを「コードする」DNA構築物を使用することを含み、その結果、トランスフェクトした細胞は、内因性メッセージを破壊しそして翻訳を阻害するに十分な量のリボザイムを生成する。リボザイムはアンチセンス分子と異なり触媒性であるので、より低い細胞内濃度が効率のために必要とされる。

【 0 6 4 0 】

アンタゴニスト／アゴニスト化合物を利用して、新生物細胞および組織上での本発明のポリペプチドの細胞増殖（growth）および増殖（proliferation）効果を阻害し得る。すなわち、腫瘍の新脈管形成を刺激し、それにより異常な細胞成長および増殖を（例えば、腫瘍形成または増殖において）遅延または防止する。

【 0 6 4 1 】

このアンタゴニスト／アゴニストをまた利用して、血管過多の疾患を予防し得、そして囊外白内障（extracapsular cataract）手術後の上皮レンズ細胞の増殖を予防し得る。本発明のポリペプチドのミトジェン活性の予防はまた、バルーン血管形成術後の再狭窄のような場合に要求され得る。

【 0 6 4 2 】

このアンタゴニスト／アゴニストをまた利用して、創傷治癒の間の瘢痕組織の増殖を予防し得る。

【 0 6 4 3 】

アンタゴニスト／アゴニストをまた利用して、本明細書中に記載される疾患を処置し得る。

【 0 6 4 4 】

従って、本発明は、以下を含むがこれらに限定されない、障害または疾患を処置する方法を提供する：患者に（a）本発明のポリヌクレオチドに対するアンチ

センス分子および／または (b) 本発明のポリヌクレオチドに対するリボザイムを投与することによって本発明のポリヌクレオチドの過剰発現に関連する、本願中に列挙された障害または疾患。

【 0 6 4 5 】

(結合ペプチドおよび他の分子)

本発明はまた、PTPaseポリペプチドに結合するポリペプチドおよび非ポリペプチドを同定するためのスクリーニング方法、およびそれによって同定されたPTPase結合分子を含む。これらの結合分子は、例えば、PTPaseポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストとして有用である。そのようなアゴニストおよびアンタゴニストは、本発明に従って、以下に詳細に記載される治療実施形態において使用され得る。

【 0 6 4 6 】

この方法は、以下の工程を包含する：

- a. PTPaseポリペプチドを多数の分子と接触させる工程；および
- b. このPTPaseポリペプチドに結合する分子を同定する工程。

【 0 6 4 7 】

PTPaseポリペプチドを多数の分子と接触させる工程は、多数の方法によってもたらされ得る。例えば、当業者は、PTPaseポリペプチドを固体支持体上に固定化させ、そして多数の分子の溶液を固定化PTPaseポリペプチドと接触させることを考え得る。このような手順は、固定化PTPaseポリペプチドから構成される親和性マトリックスを用いるアフィニティークロマトグラフィープロセスに類似している。次いで、PTPaseポリペプチドに対して選択的な親和性を有する分子が、親和性選択によって精製され得る。固体支持体の性質、PTPaseポリペプチドのこの固体支持体への付着に関するプロセス、溶媒、および親和性単離または親和性選択の条件は、大部分が慣用的であり、そして当業者に周知である。

【 0 6 4 8 】

あるいは、当業者はまた、多数のポリペプチドを、ポリペプチドのサブセットまたは個々のポリペプチドを含む実質的に別々の分画へ分離し得る。例えば、多

数のポリペプチドは、ゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィーなどポリペプチドの分離に関して当業者に公知の方法によって、分離され得る。個々のポリペプチドはまた、宿主細胞の外部表面上またはほぼ外部表面に発現されるような様式で、形質転換された宿主細胞（例えば、組換えファージ）によって産生され得る。次いで、個々の単離物は、PTPaseポリペプチドによって「プローブ化」され得、必要に応じて発現に必要とされるであろうインデューサーの存在下で、PTPaseポリペプチドと個々のクローンとの間で任意の選択的親和性相互作用が起こったか否かが決定される。PTPaseポリペプチドを個々のポリペプチドを含む各分画と接触させる前に、これらのポリペプチドはまず、さらなる簡便性のために固体支持体に移され得る。そのような固体支持体は、単に、例えばニトロセルロースまたはナイロンでできたフィルター膜の断片であり得る。この様式において、陽性クローンは、形質転換宿主細胞の発現ライブラリーの集団（これらは、PTPaseポリペプチドに対して選択的親和性を有するポリペプチドをコードするDNA構築物を持つ）から同定され得る。さらに、PTPaseポリペプチドに対して選択的親和性を有するポリペプチドのアミノ酸配列が、従来手段によって直接決定され得るか、またはこのポリペプチドをコードするDNAのコード配列が、頻繁により簡便に決定され得る。次いで、一次配列が、対応するDNA配列から推定され得る。アミノ酸配列がポリペプチド自身から決定されるものである場合、微小配列決定技術を使用し得る。この配列決定技術は、質量分析法を含み得る。

【 0 6 4 9 】

特定の状況において、選択的親和性相互作用の存在を決定または検出しようと試みる前に、未結合PTPaseポリペプチドあるいは未結合ポリペプチドのいずれかを、PTPaseポリペプチドおよび多数のポリペプチドの混合物から洗浄除去することが望ましくあり得る。このような洗浄工程は、PTPaseポリペプチドまたは多数のポリペプチドが固体支持体に結合している場合に、特に望ましくあり得る。

【 0 6 5 0 】

本方法に従って提供される多数の分子は、多様性ライブラリー（例えば、PT

P a s e ポリペプチドへ特異的に結合する分子をスクリーニングし得る無作為またはコンビナトリアルの、ペプチドライブラリーまたは非ペプチドライブラリー)として提供され得る。使用され得る多くのライブラリー(例えば、化学合成ライブラリー、組換えライブラリー(例えば、ファージディスプレイライブラリー)、およびインビトロ翻訳ベースのライブラリー)が、当該分野で公知である。化学合成ライブラリーの例は、以下に記載される:F o d o r ら、1991、S c i e n c e 251:767-773;H o u g h t e n ら、1991、N a t u r e 354:84-86;L a m ら、1991、N a t u r e 354:82-84;M e d y n s k i、1994、B i o / T e c h n o l o g y 12:709-710;G a l l o p ら、1994、J. M e d i c i n a l C h e m i s t r y 37(9):1233-1251;O h l m e y e r ら、1993、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 90:10922-10926;E r b ら、1994、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 91:11422-11426;H o u g h t e n ら、1992、B i o t e c h n i q u e s 13:412;J a y a w i c k r e m e ら、1994、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 91:1614-1618;S a l m o n ら、1993、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 90:11708-11712;P C T 公開 W O 93/20242;ならびに B r e n n e r および L e r n e r、1992、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 89:5381-5383。

【0651】

ファージディスプレイライブラリーの例は、以下に記載される:S c o t t および S m i t h、1990、S c i e n c e 249:386-390;D e v l i n ら、1990、S c i e n c e、249:404-406;C h r i s t i a n、R. B. ら、1992、J. M o l. B i o l. 227:711-718);L e n s t r a、1992、J. I m m u n o l. M e t h. 152:149-157;K a y ら、1993、G e n e 128:59-65;ならびに P C T 公開番号 W O 94/18318(1994年8月18日)。

【0652】

インビトロ翻訳ベースのライブラリーとしては、以下：PCT公開番号WO 91/05058（1991年4月18日）；およびMattheakisら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022-9026に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0653】

非ペプチドライブラリーの例として、ベンゾジアゼピンライブラリー（例えば、Buninら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712を参照のこと）が、使用のために適応され得る。ペプチドライブラリー（Simonら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367-9371）がまた使用され得る。使用され得るライブラリーの別の例は、Ostreshら（1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11138-11142）によって記載され、ここでは、ペプチド中のアミド官能基が、過剰にメチル化（permethylate）されて、化学的に形質転換されたコンビナトリアルライブラリーを生成する。

【0654】

本発明において有用である種々の非ペプチドライブラリーは、大きい。例えば、EckerおよびCrooke（1995, Bio/Technology 13:351-360）は、種々のライブラリーの基礎を形成する化学種の間として、ベンゾジアゼピン、ヒダントイン、ピペラジンジオン、ピフェニル、糖アナログ、 β -メルカプトケトン、アリール酢酸、アシルピペラジン、ベンゾピラン、キューバン（cubane）、キサントシン、アミンイミドおよびオキサゾロンを列挙している。

【0655】

非ペプチドライブラリーは、2つの型に大きく分類され得る：修飾されたモノマーおよびオリゴマー。修飾モノマーライブラリーは、比較的単純な骨格構造を使用し、この上に種々の官能基が付加される。しばしば、骨格は、既知の有用な薬理学的活性を有する分子である。例えば、骨格は、ベンゾジアゼピン構造であり得る。

【 0 6 5 6 】

非ペプチドオリゴマーライブラリーは、モノマーの順序に依存して新規な形状を作製する様式で共にアセンブルされる、多数のモノマーを使用する。使用されるモノマー単位の間には、カルバメート、ピロリノン (pyrrolinone) およびモルホリノがある。ペプチド (側鎖が α 炭素よりも α アミノ基に結合するペプチド様オリゴマー) は、非ペプチドオリゴマーライブラリーの別のバージョンの基礎を形成する。最初の非ペプチドオリゴマーライブラリーは、単一型のモノマーを使用し、従って、反復骨格を含む。近年のライブラリーは、1つより多くのモノマーを使用し、自由度が添加されたライブラリーを与える。

【 0 6 5 7 】

ライブラリーをスクリーニングすることは、多様な一般的に公知の方法のいずれかによって達成され得る。例えば、ペプチドライブラリーのスクリーニングを開示する以下の参考文献：ParmleyおよびSmith、1989、Adv. Exp. Med. Biol. 251: 215-218; Scottt.およびSmith、1990、Science 249: 386-390; Fowlkesら、1992; BioTechniques 13: 422-427; Oldenburgら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5393-5397; Yuら、1994、Cell 76: 933-945; Staudtら、1988、Science 241: 577-580; Bockら、1992、Nature 355: 564-566; Tuerkら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6988-6992; Ellingtonら、1992、Nature 355: 850-852; 米国特許第5, 096, 815号、米国特許第5, 223, 409号、および米国特許第5, 198, 346号 (全てLadnerらに対して); RebarおよびPabo、1993、Science 263: 671-673; ならびにPCT公開番号WO94/18318を参照のこと。

【 0 6 5 8 】

特定の実施形態において、PTPaseポリペプチドを結合する分子を同定するためのスクリーニングは、ライブラリーのメンバーを固相に固定化されたPT

P a s e ポリペプチドと接触させ、そしてP T P a s e ポリペプチドに結合するそれらのライブラリーのメンバーを収集することによって実行され得る。そのようなスクリーニング方法の例の、「パニング」と呼ばれる技術は、例として、P a r m l e y およびS m i t h, 1988, G e n e 73:305-318; F o w l k e s ら、1992, B i o T e c h n i q u e s 13:422-427; P C T 公開番号W O 94/18318; ならびに本明細書中に引用される参考文献に記載される。

【0659】

別の実施形態において、酵母中の相互作用タンパク質を選択するためのツーハイブリッドシステム (F i e l d s およびS o n g, 1989, N a t u r e 340:245-246; C h i e n ら、1991, P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 88:9578-9582) が、P T P a s e ポリペプチドに特異的に結合する分子を同定するために使用され得る。

【0660】

P T P a s e 結合分子がポリペプチドである場合、このポリペプチドは、任意のペプチドライブラリー (ランダムペプチドライブラリー、コンビナトリアルペプチドライブラリー、またはバイアスペプチドライブラリーを含む) から簡便に選択され得る。用語「バイアス (b i a s e d)」は、ライブラリーを作製する方法が、生じる分子収集 (この場合には、ペプチド) の多様性を支配する1つ以上のパラメーターを制限するように操作されることを意味するために本明細書中で使用される。

【0661】

従って、本当にランダムなペプチドライブラリーは、ペプチドの所定の位置に特定のアミノ酸を見出す可能性が全て20のアミノ酸に関して同じである、ペプチドの収集物を作製する。しかし、例えば、リジンが5番目のアミノ酸毎に生じることを特定するかまたはデカペプチドライブラリーの4位、8位および9位がアルギニンのみを含むように固定して特定することによって、バイアスがライブラリーに導入され得る。明らかに、バイアスの多くの型は、意図され得、そして本発明は、いかなる特定のバイアスにも制限されない。さらに、本発明は、特定

の型のペプチドライブラリー（例えば、ファージディスプレイペプチドライブラリーおよびDNA挿入物と共に入ファージベクターを含むDNA構築物を使用するライブラリー）を意図する。

【 0 6 6 2 】

上記のように、ポリペプチドであるPTPase結合分子の場合、このポリペプチドは、約6から約60より少ないアミノ酸残基を有し、好ましくは約6～約10アミノ酸残基、そして最も好ましくは約6～約22アミノ酸であり得る。別の実施形態において、PTPase結合ポリペプチドは、15～100の範囲のアミノ酸、または20～50の範囲のアミノ酸を有する。

【 0 6 6 3 】

選択されたPTPase結合ポリペプチドは、化学合成または組換え発現によって得られ得る。

【 0 6 6 4 】

（他の活性）

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、血管内皮細胞増殖を刺激する能力の結果として、種々の疾患状態（例えば、血栓症、動脈硬化、および他の心臓血管の状態）に起因する虚血組織の血管再生を刺激するための処置において利用され得る。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストをまた利用して、上記で議論されるように新脈管形成および肢の再形成を刺激し得る。

【 0 6 6 5 】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストをまた、傷害、熱傷、手術後組織修復、および瘢痕に起因する創傷の処置にも利用し得る。なぜなら、それらは異なる起源の種々の細胞（例えば、線維芽細胞および骨格筋細胞）に対してマイトジェン性であり、それゆえダメージを受けた組織または疾患組織の修復または置換を促進するからである。

【 0 6 6 6 】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストをまた使用して、ニューロンの成長を刺激し、そして特定のニューロンの障害ま

たは神経変性状態（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、およびA I D S 関連複合体）において生じるニューロンのダメージを処置および予防し得る。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、軟骨細胞増殖を刺激する能力を有し得、それゆえ、それらは、骨および歯周の再形成を増強し、そして組織移植片または骨の移植片における補助のために利用され得る。

【 0 6 6 7 】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストをまた利用して、ケラチノサイト増殖を刺激することにより、日焼けに起因する皮膚の老化を予防し得る。

【 0 6 6 8 】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストをまた、抜け毛を予防するためにも利用し得る。なぜなら、F G Fファミリーのメンバーは、髪形成細胞を活性化し、そしてメラノサイト増殖を促進するからである。同じ系列にそって、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストを利用して、他のサイトカインと組み合わせて使用した場合、造血細胞および骨髄細胞の増殖および分化を刺激し得る。

【 0 6 6 9 】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストをまた利用して、移植前の器官を維持し得るか、または始原組織の細胞培養を支持するために使用し得る。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストはまた、初期胚における分化のための中胚葉起源の組織を誘導するために利用され得る。

【 0 6 7 0 】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストはまた、先に議論されるように、造血系統に加えて胚性幹細胞の分化または増殖を増加または減少し得る。

【 0 6 7 1 】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニスト

はまた、哺乳動物の特徴（例えば、身長、体重、毛の色、眼の色、皮膚、脂肪組織の割合、色素沈着、大きさ、および形（例えば、美容外科））を調節するために使用され得る。同様に、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、異化作用、同化作用、プロセッシング、利用、およびエネルギーの貯蔵に影響を及ぼす哺乳動物の代謝を調節するために使用され得る。

【 0 6 7 2 】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、肥満症、悪液質、消耗病、食欲不振および過食症を含むがこれらに限定されない重量障害を処置するために使用され得る。

【 0 6 7 3 】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、バイオリズム、カリカディック (c a r i c a d i c) リズム、うつ病（抑うつ性障害を含む）、暴力の傾向、痛みへの耐性、生殖能力（好ましくは、アクチビンまたはインヒビン様活性によって）、ホルモンレベルもしくは内分泌レベル、食欲、性欲、記憶、ストレス、または他の認知の質に影響を及ぼすことによって、哺乳動物の精神状態または身体状態を変更するために使用され得る。

【 0 6 7 4 】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストはまた、例えば、貯蔵能力、脂肪含有量、脂質、タンパク質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、補因子、または他の栄養成分を増加または減少させるような食品添加物または保存剤として使用され得る。

【 0 6 7 5 】

上記に列挙される用途は、広範な種々の宿主において使用される。このような宿主としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：ヒト、ネズミ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、ミニブタ (m i c r o - p i g)、ニワトリ、ヤギ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類、およびヒト。特定の実施形態において、宿主は、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ニワトリ、ラット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、イヌまた

はネコである。好ましい実施形態において、宿主は哺乳動物である。最も好ましい実施形態において、宿主は、ヒトである。

【 0 6 7 6 】

(他の好ましい実施形態)

本願発明の他の好ましい実施形態は、配列番号 X のヌクレオチド配列またはそれに対する相補鎖、および／または c D N A プラスミド V における少なくとも約 5 0 の連続したヌクレオチドの配列に、少なくとも 9 5 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を含む。

【 0 6 7 7 】

上記連続したヌクレオチドの配列が、表 1 中の配列番号 X について同定される位置の範囲で、配列番号 X のヌクレオチド配列に含まれる核酸分子もまた好ましい。

【 0 6 7 8 】

配列番号 X またはその相補鎖のヌクレオチド配列、および／または c D N A プラスミド V のヌクレオチド配列中の、少なくとも約 1 5 0 の連続するヌクレオチドの配列に、少なくとも 9 5 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子もまた好ましい。

【 0 6 7 9 】

配列番号 X またはその相補鎖のヌクレオチド配列、および／または c D N A プラスミド V のヌクレオチド配列中の、少なくとも約 5 0 0 の連続するヌクレオチドの配列に、少なくとも 9 5 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子は、さらに好ましい。

【 0 6 8 0 】

さらに好ましい実施形態は、表 1 において配列番号 X について同定された位置の範囲における配列番号 X のヌクレオチド配列に少なくとも 9 5 % 同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子である。

【 0 6 8 1 】

さらに好ましい実施形態は、配列番号 X の完全ヌクレオチド配列もしくはその相補鎖、および／または c D N A プラスミド V のヌクレオチド配列に少なくとも

95%同一であるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子である。

【0682】

配列番号Xのヌクレオチド配列もしくはその相補鎖、および／またはcDNAプラスミドVのヌクレオチド配列を含む核酸分子に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする単離された核酸分子もまた好ましく、ここで上記のハイブリダイズする核酸分子は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、A残基のみまたはT残基のみからなるヌクレオチド配列を有する核酸分子にハイブリダイズしない。

【0683】

cDNAプラスミドVを含むDNA分子を含む物質の組成物もまた、好ましい。

【0684】

cDNAプラスミドVのヌクレオチド配列中の少なくとも50の連続するヌクレオチドの配列に少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子もまた好ましい。

【0685】

少なくとも50の連続するヌクレオチドの上記配列が、cDNAプラスミドVによりコードされるオープンリーディングフレーム配列のヌクレオチド配列に含まれる、単離された核酸分子もまた好ましい。

【0686】

cDNAプラスミドVによりコードされるヌクレオチド配列において少なくとも150の連続するヌクレオチドの配列に少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子もまた好ましい。

【0687】

さらに好ましい実施形態は、cDNAプラスミドVによりコードされるヌクレオチド配列中の少なくとも500の連続するヌクレオチドの配列に少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子である。

【0688】

さらに好ましい実施形態は、cDNAプラスミドによってコードされる完全な

ヌクレオチド配列に少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子である。

【0689】

さらに好ましい実施形態は、以下からなる群から選択される配列中の少なくとも50の連続したヌクレオチドの配列に少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を、生物学的サンプルにおいて検出するための方法である：配列番号Xのヌクレオチド配列またはそれに相補的な鎖、およびcDNAプラスミドVによってコードされるヌクレオチド配列；この方法は、上記サンプル中の少なくとも1つの核酸分子のヌクレオチド配列を、上記の群から選択された配列と比較する工程および上記サンプル中の上記核酸分子の配列が、上記選択された配列に少なくとも95%同一であるか否かを決定する工程を包含する。

【0690】

上記の配列を比較する工程が、上記サンプル中の核酸分子と、上記の群から選択される上記の配列を含む核酸分子との間の核酸ハイブリダイゼーションの程度を決定する工程を包含する、上記方法もまた好ましい。同様に、上記の配列を比較する工程が、上記サンプル中の核酸分子から決定されるヌクレオチド配列と、上記の群から選択される配列とを比較する工程によって実施される、上記方法もまた好ましい。核酸分子は、DNA分子またはRNA分子を含み得る。

【0691】

さらに好ましい実施形態は、生物学的サンプルの種、組織、または細胞型を同定するための方法であって、この方法は、以下からなる群から選択される配列中の少なくとも50の連続したヌクレオチドの配列に少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む上記サンプル中の核酸分子を（もしあれば）検出する工程を包含する：配列番号Xのヌクレオチド配列またはその相補鎖およびcDNAプラスミドVによってコードされるヌクレオチド配列。

【0692】

生物学的サンプルの種、組織、または細胞型を同定するための方法は、少なくとも2つのヌクレオチド配列のパネル中のヌクレオチド配列を含む核酸分子を検出する工程を包含し得、ここで上記パネル中の少なくとも1つの配列は、上記の

群から選択される配列中の少なくとも50の連続したヌクレオチドの配列に少なくとも95%同一である。

【0693】

タンパク質をコードする配列番号Xまたはその相補鎖またはcDNAプラスミドVのヌクレオチド配列の異常な構造または発現と関連する病理学的状態を、被験体において診断するための方法もまた好ましく、この方法は、以下からなる群から選択される配列中の少なくとも50の連続したヌクレオチドの配列に少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む、核酸分子（もしあれば）を、上記被験体から得られる生物学的サンプルにおいて検出する工程を包含する：配列番号Xのヌクレオチド配列またはその相補鎖およびcDNAのプラスミドVのヌクレオチド配列。

【0694】

病理学的状態を診断するための方法は、少なくとも2つのヌクレオチド配列のパネル中のヌクレオチド配列を含む核酸分子を検出する工程を包含し得、ここで、上記パネル中の少なくとも1つの配列は、上記群から選択される配列中の少なくとも50の連続したヌクレオチドの配列に少なくとも95%同一である。

【0695】

上記の核酸分子のヌクレオチド配列が、少なくとも2つのヌクレオチド配列のパネルを含む、単離された核酸分子を含む物質の組成物もまた好ましく、ここで上記のパネル中の少なくとも1つの配列は、以下からなる群から選択される配列中の少なくとも50個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも95%同一である：配列番号Xのヌクレオチド配列またはその相補鎖およびcDNAプラスミドVによりコードされるヌクレオチド配列。この核酸分子は、DNA分子またはRNA分子を含み得る。

【0696】

配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよび／またはcDNAプラスミドVによりコードされるポリペプチド中の少なくとも約10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた好ましい。

【 0 6 9 7 】

配列番号 Y のアミノ酸配列；配列番号 X もしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列および／または c D N A プラスミド V によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列中の少なくとも約 3 0 個連続したアミノ酸の配列と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた好ましい。

【 0 6 9 8 】

配列番号 Y のアミノ酸配列；配列番号 X もしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列および／または c D N A プラスミド V によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列中の少なくとも約 1 0 0 個連続したアミノ酸の配列と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドはさらに好ましい。

【 0 6 9 9 】

配列番号 Y の完全なアミノ酸配列；配列番号 X もしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドの完全なアミノ酸配列および／または c D N A プラスミド V によりコードされるポリペプチドの完全なアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドはさらに好ましい。

【 0 7 0 0 】

c D N A プラスミド V によりコードされるポリペプチドの完全なアミノ酸配列中の少なくとも約 1 0 個連続したアミノ酸の配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドはさらに好ましい。

【 0 7 0 1 】

上記の連続したアミノ酸の配列が、c D N A プラスミド V によってコードされる上記ポリペプチド；配列番号 X もしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよび／または配列番号 Y のポリペプチド配列の一部のアミノ酸配列に含まれる、ポリペプチドもまた好ましい。

【 0 7 0 2 】

c D N A プラスミド V によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列中の少なくとも約 3 0 個連続したアミノ酸の配列と少なくとも 9 5 % 同一であるアミ

ノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【 0 7 0 3 】

cDNAプラスミドVによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列中の少なくとも約100個連続したアミノ酸の配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【 0 7 0 4 】

cDNAプラスミドVによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【 0 7 0 5 】

以下からなる群から選択される配列中の、少なくとも10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して特異的に結合する単離された抗体は、さらに好ましい：配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよびcDNAプラスミドVによりコードされるポリペプチド。

【 0 7 0 6 】

以下：配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよびcDNAプラスミドVによりコードされるポリペプチドからなる群から選択された配列中の、少なくとも10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを、生物学的サンプルにおいて検出する方法はさらに好ましく；この方法は、このサンプル中における少なくとも1つのポリペプチド分子のアミノ酸配列をこの群から選択された配列と比較する工程およびこのサンプル中におけるこのポリペプチド分子の配列が、少なくとも10個連続したアミノ酸のこの配列と少なくとも90%同一であるかどうかを決定する工程を包含する。

【 0 7 0 7 】

このサンプル中における少なくとも1つのポリペプチド分子のアミノ酸配列を、この群から選択された配列と比較するこの工程が、このサンプル中のポリペプチドの、以下：配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖

によりコードされるポリペプチドおよびcDNAプラスミドVによりコードされるポリペプチドからなる群から選択された配列中の少なくとも10個連続したアミノ酸の配列に対して、少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する抗体に対する特異的な結合の程度を決定する工程を包含する、上記の方法もまた、好ましい。

【0708】

配列を比較するこの工程が、このサンプル中のポリペプチド分子から決定されたアミノ酸配列を、この群から選択されたこの配列と比較することによって行われる、上記の方法もまた好ましい。

【0709】

生物学的サンプルの種、組織または細胞型を同定する方法もまた好ましく、ここでこの方法は、もし存在するならば、以下からなる群から選択される配列における少なくとも10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド分子をこのサンプル中で検出する工程を包含する：配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよびcDNAプラスミドVによりコードされるポリペプチド。

【0710】

生物学的サンプルの種、組織または細胞型を同定する上記の方法もまた好ましく、ここでこの方法は、少なくとも2つのアミノ酸配列のパネルにおけるアミノ酸配列を含むポリペプチド分子を検出する工程を包含し、ここでこのパネル中の少なくとも1つの配列は、上記の群から選択された配列における少なくとも10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一である。

【0711】

被験体において、表1において同定された、ポリペプチドをコードする核酸配列の異常な構造または発現に関連する病的状態を診断する方法もまた、好ましく、ここで、この方法は、この被験体から得られた生物学的サンプルにおいて、少なくとも2つのアミノ酸配列のパネルにおけるアミノ酸配列を含むポリペプチド分子を検出する工程を含み、ここでこのパネル中の少なくとも1つの配列は、以

下からなる群から選択される配列における少なくとも10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一である：配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよびcDNAプラスミドVによりコードされるポリペプチド。

【0712】

これらの方法のいずれかにおいて、上記ポリペプチド分子を検出する工程は、抗体を使用することを包含する。

【0713】

以下からなる群から選択された配列中の、少なくとも10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子もまた、好ましい：配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよびcDNAプラスミドVによりコードされるポリペプチド。

【0714】

上記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、原核生物宿主でのこのポリペプチドの発現について最適化されている、単離された核酸分子もまた、好ましい。

【0715】

上記ポリペプチドが以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離された核酸分子もまた、好ましい：配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよびcDNAプラスミドVによりコードされるポリペプチド。

【0716】

上記の単離された核酸分子のいずれかをベクター中に挿入する工程を含む、組換えベクターの作製方法はさらに好ましい。この方法によって生成された組換えベクターもまた、好ましい。宿主細胞中にベクターを導入する工程を含む、組換え宿主細胞を作製する方法、ならびにこの方法によって生成された組換え宿主細胞もまた、好ましい。

【 0 7 1 7 】

単離されたポリペプチドを作製する方法であって、このポリペプチドが発現されるような条件下でこの組換え宿主細胞を培養する工程、およびこのポリペプチドを回収する工程を包含する、方法もまた好ましい。この組換え宿主細胞が真核生物細胞であり、そしてこのポリペプチドが以下からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むヒトタンパク質である、単離されたポリペプチドを作製するこの方法もまた好ましい：配列番号 Y のポリペプチド配列；配列番号 X もしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよび cDNA プラスミド V によりコードされるポリペプチド。この方法によって生成された単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【 0 7 1 8 】

増加したレベルのタンパク質活性を必要とする個体を処置する方法もまた、好ましく、ここで、この方法は、このような個体に、この個体においてこのタンパク質の活性のレベルを増加させるのに有効な量の、本願発明の単離されたポリペプチド、ポリヌクレオチド、その免疫原性フラグメントもしくはアナログ、結合因子、抗体、あるいは抗原結合フラグメントを含む治療剤を投与する工程を包含する。

【 0 7 1 9 】

減少したレベルのタンパク質活性を必要とする個体を処置する方法もまた、好ましく、ここで、この方法は、このような個体に、この個体においてこのタンパク質の活性のレベルを減少させるのに有効な量の、本願発明の単離されたポリペプチド、ポリヌクレオチド、その免疫原性フラグメントもしくはアナログ、結合因子、抗体、あるいは抗原結合フラグメントを含む治療剤を投与する工程を包含する。

【 0 7 2 0 】

本発明の特定の実施形態では、表 2 の 4 番目の列に列挙される各「コンティグ ID」について、好ましくは、表 2 の 5 番目の列で参照されるヌクレオチド配列、および一般式 a - b により記載されるヌクレオチド配列（ここで a および b は、表 2 の列 3 で参照される対応する配列番号 X について独自に決定される）を含

むか、またはあるいはそのようなヌクレオチド配列からなる、1つ以上のポリヌクレオチドが除外される。さらに特定の実施形態は、表2の5番目の列において参照される特定のポリヌクレオチド配列の1、2、3、4個、またはそれ以上を除外するポリヌクレオチド配列に関する。

【0721】

好ましくは、一般式c-dにより記載されるヌクレオチド配列（ここでcおよびdの両方が、配列番号Xに示されるヌクレオチド残基の位置に対応し、dがc+14より大きいまたは等しい）を含む1以上のポリヌクレオチドが本発明から除外される。

【0722】

この表は、この一般式により除外され得る配列の全てを含むことを決して意味せず、この表は、単に例示的な例である。これらの登録を通じて利用可能な全ての参考文献は、本明細書によりその全体が参考として援用される。

【0723】

【表2】

表2

遺伝子 番号	cDNA クローンID 番号V	ヌクレ オチド 配列 番号X	インテグ ID	公開登録番号
1	HATBM23	2	1020740	AA443172, AW241948, D62174, D79354, AA AL050040.
2	HD1BD67	3	1020742	AW242597, AW069086, AI48152, AI125778, AA AL257961.
3	HE8TZ69	4	1020743	R40435, AA362736, AA362733, AA350593, R52374, H48860, AI261913, AL042377, AI205181, AW450533, H96580, AA318012, T03368, R37608, AI986251, AA423864, AI186470, AI431232, N66012, AA846417, AA653975, AA301688, R43331, T06510, AA838333, AA299275, AA813902, AA922561, AW272925, AA378995, AI687855, AI027602, AA028137, AW025031, AA121504, AA319990, AA487500, AA809126, H15679, W04442, AW276172, R59178, H47145, AI133656, AA666398, AI082382, N54603, AI367471, AA938546, AI733304, AI805380, H90232, AI367401, AI367420, AI684208, AI677668, AA013247, AA865184, H80367, AL035981, N67018, T87597, AI803791, AA916089, AI923125, AA666384, AI580791, AW452296, AI269411, AA374166, AI743643, AA479873, R22044, AA601182, AI547144, AI969988, AW338292, R42293, AA018446, AI758256, AC005899, AC004970, AL024498, U95739, AP000152, AL035072, AL035468, AC003012, AL133163, AC005008, AP000010, AC002117, AL031121, AC006518, AC002091, AC005255, AC005599, AC005225, AC002511, AC002420, AL079340, AC007385, AC004972, AC006449, AL109627, AF196779, AC005536, AC004755, AC004097, AC002070, AC002310, AC005800,

(表2続き①)

				AC009516, AC005668, AC007738, AC005005, AP001116, AL021528, AC004491, AF001549, AL031775, AC006237, AC003663, AC003999, AC007435, AL008725, D86566, AC008275, AF108083, AC004859, AC005180, Z48051, AC005831, AC006162, AL022326, AL031311, AP000278, AC007685, AC004477, Z99127, AC004552, AC005747, AC005486, AL035089, AC008115, AL049797, AL009174, AC004000, AC004065, AC007051, AC004953, AC005921, AP000535, AC007380, AL022476, AC005484, U82828, AF055066, AC004934, AP000038, AP000106, AL022316, AC004638, AC005274, AC004485, U89335, AC002316, AC003092, AC009233, AP000493, AF053356, Z97630, AL021578, Z82206, AC002300, Z83844, AC003950, U92032, AC002543, AC004526, AC004616, AC006511, Z85996, AB020872, AL031223, AC005037, AC003043, AC004983, AL031228, AC002401, AC006928, AC007284, AC004910, AC006582, AL078463, AF064866, Z93017, AC004905, AF038458, AC004056, AC005695, AL035249, AC004706, AC005011, AL031427, AC005358, AC005221, AJ238093, Z49258, AC005206, AC005839, AL033527, AC004673, AC005969, AL021069, Z95114, Z85987, AC006359, AC004963, AF107885, AC009479, AC004522, AP000512, Z84476, Z84469, AC005875, AC008085, AP000044, AC002990, AC007279, AP000503, AC006163, AC007221, AC005367, AC007919, AR036572, U91328, AC005632, AL117328, AP000536, AC016830, AC005914, AC006251, Z75889, AF000068.
4	HBJHC73	5	1020741	AL047740, AI132911, AA156195, AL048631, AA837501, AA211604, AI114672, AA806219, AI525547,

(表 2 続き ②)

			AA101199, AI132942, AI740980, AI525852, AA593692, AA837552, AA722510, AI065135, C18511, AL036513, AA641259, AA211562, AA555222, AA809068, AA081175, AA533073, AA069787, AA643360, AA876523, AA551211, AA211500, AI110658, AA131338, AA809120, AA216525, AW131551, AA808965, AA548858, AI525715, AA548322, AW166949, AW027425, AA714382, AA533425, AA554476, AA555052, AA563906, AA593698, AA856781, AA565377, AA180349, AA555049, AA565897, AA876475, AA714377, AA554931, AA575889, AA485302, AA595706, AI285761, AA211601, AA554579, AA654346, AA578668, AA593792, AI281529, AA193227, AA643016, AA548856, AA809137, AA642904, AI086871, AA187780, AA548947, AA554597, AI814555, AA652684, AA576595, C75634, AA548327, AI749119, AA837570, AI817400, AW149703, AA582730, AA178950, AA714083, AA548235, AA602770, AA826894, AA643290, AI581935, AA564005, AI557259, AI758817, AA555068, AA180957, AA211650, AA548852, AI253300, AA613857, AA642909, AA593716, AA548854, AA554106, AA554734, AA595814, AA564032, AI525621, AA868519, AA164534, AA194486, AA548840, AA553534, AA608673, AA551018, AA876477, AA071081, AA548843, AI185374, AA564208, AA180817, C75443, AA196049, AA565762, AA643162, AA812395, AI065161, AA553856, AA563954, AA527965, AA595039, AA618018, AI525637, AA193111, AI281608, AA595777, AI174926, AA593766, AI253294, AA563762, AA563996, AA178934, AA194292, AA640962, AA622317, AA563866, AA575827, AA595579, AA838283, AA928697,
--	--	--	---

(表 2 系統 ③)

			AA582732, AA931630, AA595593, AA281644, AA181370, AA281587, AA812398, AA578872, AA327044, AA720680, AA837567, AA563919, AA975655, AA188159, AA577493, AA563890, AA565987, AA640498, AA643091, AA038898, AA179813, AA857084, AA525888, AA837556, AA100716, AA249295, AA908628, AA604265, AA525840, AA167501, AA834311, AA911717, AA167502, AA171849, AA834293, AA554409, AA554105, AA146983, AA102881, AA197028, AA064936, AA218984, AA547040, AA134963, AA165318, AA654403, AA582733, AA525813, AA834304, AA551189, AA469357, AA601046, AA158895, AA038120, AA548329, AA525861, AA663169, AA469382, AA818247, AA071163, AA101185, AA548936, AA128974, AA7533, AA884535, AA954864, AA528302, AA575871, AA595592, AA642919, AA208935, AA7238593, AA565784, AA525729, AA196046, AA132430, AA548937, AA071006, AA532398, AA586601, AA196225, AA152241, AA554592, AA599461, AA181430, AA211439, AA707518, AA640654, AA180191, AA548323, AA099906, AA477124, AA707538, AA79741, AA813623, AA525709, AA554025, AA586705, AA548846, AA525810, AA054990, AA0710, AA62996, AA0662, AA1415, AA93334, AA38112, AA028448, AA50525, AA93335, AA38113, AA93347, AA38116, AA38114, AA86996, AA86998, AA99256, AA38115, AA86990, AA97707, AA18001, AA17170, AA02226, AA17174, AA12298, AA71621, AA66061, AA019564, AA010812, AA97343, AA069539, AA07726, AA01394, AA00654, AA86493, AA017708, AA203744, AA97337, AA179290, AA203743, AA203741, AA18621, AA86501, AA86500, AA55541, AA089815, AA00665, AA010406, AA07096, AA069536, AA00711, AA07095, AA179288, AA032843, AA203727, AA88898, AA72004, AA203774, AA0753, AA089537, AA35876, AA97336, AA033608, AA86496, AA027948, AA069533, AA07734, AA19192, AA203742, AA86494, AA86499, AA55539, AA86495, AA35875, AA010814, AA86497, AA203773, AA35877, AA63726, AA35874, AA069537, AA203740, AA86493, AA190672, AA04413, AA92229, AA48926.
5	RTJLM25	6	1027721

【 0 7 2 4 】

【 表 3 】

表3

クローンID番号	ライブラリーコード
HATBM23	H0156 H0266 H0560 H0581 H0663 H0696 L1290 S0242 S6028
HD1BD67	H0486
HE8TZ69	H0013
HBJHX73	H0318
HTEJM25	H0038 L1290

【 0 7 2 5 】

【 表 4 】

表4

ライブラリーコード	ライブラリーの記載	疾患
H0013	ヒト8週全胚	
H0038	ヒト精巣	
H0051	ヒト海馬	
H0052	ヒト大脳	
H0156	ヒト副腎腫瘍	疾患
H0212	ヒト前立腺、除去済	
H0263	ヒト結腸癌	疾患
H0265	活性化T細胞(12時間)/チオリジン標識Eco	
H0266	ヒト微小血管内皮細胞、画分A	
H0318	ヒトB細胞リンパ種	疾患
H0416	ヒト好中球、活性化、再切除	
H0431	ヒト腎臓腫瘍、再切除	
H0486	ホジキンリンパ種II	疾患
H0521	一次樹状細胞、ライブラリー1	
H0522	一次樹状細胞、画分2	
H0560	KMH2	
H0575	ヒト成人肺、再切除	
H0581	ヒト骨髄、処置済	
H0644	ヒト胎盤(再切除)	
H0663	胸部、癌(4005522 A2)	疾患
H0696	前立腺腺癌	
L1290	Soares fetal heart NbHH19W	
S0001	脳前頭皮質	
S0010	ヒト扁桃	
S0027	平滑筋、血清処置済	
S0242	滑液膜繊維芽細胞(I11/TNF)、除去済	
S0358	結腸正常III	
S0378	脾臓腫瘍	
S0440	肝臓腫瘍 Met 5 Tu	
S3014	平滑筋、血清誘導、再除去	
S6028	ヒト躁鬱病組織	疾患
T0039	HSA 172細胞	

概して、本発明を記載してきたが、例示の目的のために提供されかつ限定することを意図しない、以下の実施例を参照することによって、本発明はより容易に

理解される。

【0726】

(実施例)

(実施例1：選択されたcDNAクローンの寄託されたサンプルからの単離)

引用されるATCC受託物中の各cDNAクローンは、プラスミドベクター中に含まれる。表1は、各クローンが単離されたcDNAライブラリーを構築するために用いられたベクターを同定する。多くの場合において、ライブラリーを構築するために使用されたベクターは、プラスミドが切り出されたファージベクターである。すぐ下の表は、cDNAライブラリーを構築する際に使用される各ファージベクターについて関連するプラスミドを相関づける。例えば、特定のクローンがベクター「Lambda Zap」中に単離されていると表1に同定される場合、対応する受託クローンは、「pBluescript」中である。

【0727】

【表5】

<u>ライブラリーを構築するための使用されたバクター</u>		<u>対応する発光クロン</u>
Lambda Zap	..	pBluescript (pBS)
Uni-Zap XR	..	pBluescript (pBS)
Zap Express	..	pBK
lalfmid BA	..	plafmid BA
pSport1	..	pSport1
pCMVSPORT 2.0	..	pCMVSPORT 2.0
pCMVSPORT 3.0	..	pCMVSPORT 3.0
pCR [®] 2.1	..	pCR [®] 2.1

ベクター Lambda Zap (米国特許第5, 128, 256号および同第5, 286, 636号)、Uni-Zap XR (米国特許第5, 128, 256号および同第5, 286, 636号)、Zap Express (米国特許第5, 128, 256号および同第5, 286, 636号)、pBluescript (pBS) (Shortら、Nucleic Acids Res. 16: 7583-7600 (1988); Altling-Meesら、Nucleic Acids Res. 17: 9494 (1989)) ならびに pBK (Altling-Meesら、Strategies 5: 58-61 (1992)) は、Stratagene Cloning Systems, Inc.、11

011 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037から市販されている。pBSは、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてpBKはネオマイシン耐性遺伝子を含む。両方とも、E. coli株XL-1 Blue（これもまた、Stratageneから入手可能である）に形質転換され得る。pBSは、SK+、SK-、KS+およびKSの4形態で入荷する。SおよびKとは、ポリリンカー領域（「S」とはSacIであり、そして「K」とは、KpnIのことであり、これらは、リンカーのそれぞれの各末端での最初の部位である）に隣接するT7およびT3プライマー配列に対するポリリンカーの配向をいう。「+」または「-」とは、ある方向においてf1 oriから開始される一本鎖レスキューがセンス鎖DNAを生成し、そして他方においてアンチセンスであるようなf1複製起点（「ori」）の配向をいう。

[0 7 2 8]

ベクターpSport1、pCMVSport 2.0およびpCMVSport 3.0をLife Technologies, Inc., P. O. Box 6009, Gaithersburg, MD 20897から入手した。全てのSportベクターはアンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてE. coli株DH10B（これもまた、Life Technologiesから入手可能である）に形質転換され得る。（例えば、Gruber, C. E. ら、Focus 15:59（1993）を参照のこと）。ベクターlafmid BA（Bento Soares, Columbia University, NY）は、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてE. coli株XL-1 Blueに形質転換され得る。ベクターpCR（登録商標）2.1（これはInvitrogen, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008から入手可能である）は、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてE. coli株DH10B（Life Technologiesから入手可能である）に形質転換され得る（例えば、Clark, Nuc. Acids Res. 16:9677-9686（1988）およびMeadら、Bio/Technology 9:（1991）を参照のこと）。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、表1における特定のクローンについて同定されたファージベクター配

列、ならびに上記に示された対応するプラスミドベクター配列を含まない。

【 0 7 2 9 】

表 1 に引用される、任意の所定の c D N A クローンについて A T C C 受託番号を与えられたサンプルにおける寄託された物質はまた、1つ以上のさらなるプラスミド（これは各々、その所定のクローンとは異なる c D N A クローンを含む）を含み得る。従って、同じ A T C C 受託番号を共有する寄託物は、表 1 に同定される各 c D N A クローンのためのプラスミドを少なくとも含む。代表的には、表 1 に引用される各 A T C C 寄託物のサンプルは、ほぼ等量（重量で）の約 5 0 個のプラスミド D N A（これは各々、異なる c D N A クローンを含む）の混合物を含む；しかし、このような寄託サンプルは、5 0 個よりも多いかまたは少ない c D N A クローン（約 5 0 0 個までの c D N A クローン）のためのプラスミドを含み得る。

【 0 7 3 0 】

表 1 における特定のクローンについて引用されるプラスミド D N A の寄託サンプルからそのクローンを単離するために 2 つのアプローチが使用され得る。第一に、プラスミドを、配列番号 X に対応するポリヌクレオチドプローブを使用して、クローンをスクリーニングすることによって直接単離する。

【 0 7 3 1 】

特に、3 0 ～ 4 0 ヌクレオチドを有する特定のポリヌクレオチドを、報告されている配列に従って、A p p l i e d B i o s y s t e m s の D N A 合成装置を使用して合成する。オリゴヌクレオチドを、例えば、³²P-γ-ATP で、T 4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて標識し、そして慣用的な方法に従って精製する。（例えば、M a n i a t i s ら、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l、C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s、C o l d S p r i n g、N Y（1 9 8 2））。プラスミド混合物を、当業者に公知の技術（例えば、ベクター供給者によって提供される技術または上記で引用された関連の刊行物もしくは特許において提供される技術）を用いて、上記のような適切な宿主（例えば、X L - 1 B l u e（S t r a t a g e n e））に形質転換する。形質転換体を 1. 5 % 寒天プレート（適切な

選択薬剤、例えば、アンピシリンを含む)に、1プレートあたり約150の形質転換体(コロニー)の密度でプレーティングする。これらのプレートを、細菌コロニースクリーニングについての慣用的な方法(例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1.93~1.104頁)または当業者に公知の他の技術に従って、ナイロンメンブレンを使用してスクリーニングする。

【0732】

あるいは、配列番号Xの両端(すなわち、表1に規定されるクローンの5' NTおよび3' NTによって囲まれる配列番号Xの領域内)に由来する、17~20ヌクレオチドの2つのプライマーを合成し、そしてこれらを使用して、寄託されたcDNAプラスミドをテンプレートとして使用して、所望のcDNAを増幅する。ポリメラーゼ連鎖反応を、慣用的な条件下で、例えば、0.5 μ gの上記cDNAテンプレートを含む25 μ lの反応混合物中で実施する。便利な反応混合物は、1.5~5 mM MgCl₂、0.01% (w/v)ゼラチン、それぞれ20 μ MのdATP、dCTP、dGTP、dTTP、25 pmolの各プライマーおよび0.25ユニットのTaqポリメラーゼである。35サイクルのPCR(94℃での変性を1分間; 55℃でのアニールを1分間; 72℃での伸長を1分間)を、Perkin-Elmer Cetus自動化サーマルサイクラーを用いて実施する。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、そして予想される分子量のDNAバンドを切り出し、そして精製する。PCR産物を、DNA産物をサブクローニングおよび配列決定することによって、選択された配列であることを確認する。

【0733】

寄託されたクローンに存在しないかもしれない遺伝子の5' 非コード部分または3' 非コード部分の同定のために、いくつかの方法が利用可能である。これらの方法は、以下を含むがこれらに限定されない: フィルタープローブ探索、特異的プローブを使用するクローン富化、および当該分野で周知である5' および3' 「RACE」プロトコルと類似するかまたは同一のプロトコル。例えば、5'

RACEに類似する方法は、所望の全長転写物の欠けている5'末端を生成するために利用可能である (Fromont-Racineら、Nucleic Acids Res. 21(7):1683-1684(1993))。

【0734】

簡潔には、特定のRNAオリゴヌクレオチドを、全長遺伝子RNA転写物をおそらく含むRNAの集団の5'末端に連結する。連結されたRNAオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的の遺伝子の既知の配列に特異的なプライマーを含むプライマーセットを使用して、所望の全長遺伝子の5'部分をPCR増幅する。次いで、この増幅した産物を配列決定し得、そしてこれを使用して全長遺伝子を生成し得る。

【0735】

この上記の方法は、所望の供給源から単離された総RNAを用いて開始するが、ポリA+RNAをも使用し得る。次いで、RNA調製物を、必要ならばホスファターゼで処理して、後のRNAリガーゼ工程を妨害し得る分解または損傷RNAの5'リン酸基を排除し得る。次いで、ホスファターゼを不活化するべきであり、そしてRNAをメッセンジャーRNAの5'末端に存在するキャップ構造を除去するために、タバコ酸性ピロホスファターゼを用いて処理するべきである。この反応は、次いでT4 RNAリガーゼを用いてRNAオリゴヌクレオチドに連結され得る、キャップ切断RNAの5'末端に5'リン酸基を残す。

【0736】

この改変型RNA調製物を、遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを用いる、第一鎖cDNA合成のためのテンプレートとして使用する。第一鎖合成反応物を、連結されたRNAオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的の遺伝子の既知の配列に特異的なプライマーを用いる、所望の5'末端のPCR増幅のためのテンプレートとして使用する。次いで、得られた産物を配列決定し、そして分析して5'末端配列が所望の遺伝子に属することを確認する。

【0737】

(実施例2：ポリヌクレオチドに対応するゲノムクローンの単離)

ヒトゲノムP1ライブラリー (Genomic Systems, Inc.)

を、実施例1に記載される方法に従って、配列番号Xに対応するcDNA配列について選択されたプライマーを用いるPCRによってスクリーニングする (Sambrookもまた参照のこと)。

【0738】

(実施例3：ポリペプチドの組織分布)

本発明のポリヌクレオチドのmRNA発現の組織分布を、とりわけ、Sambrookらによって記載されるノーザンブロット分析についてのプロトコルを用いて決定する。例えば、実施例1に記載される方法によって生成されるcDNAプローブを、rediprimeTM DNA labeling system (Amersham Life Science)を用いて、製造者の指示に従って、P³²で標識する。標識後、プローブを、CHROMA SPIN-100TM カラム (Clontech Laboratories, Inc.) を使用して、製造者のプロトコル番号PT1200-1に従って精製する。次いで、精製した標識プローブを使用して、種々のヒト組織をmRNA発現について試験する。

【0739】

種々のヒト組織 (H) またはヒト免疫系組織 (IM) を含む多重組織ノーザン (MTN) ブロット (Clontech) を、ExpressHybTM ハイブリダイゼーション溶液 (Clontech) を用いて、製造者のプロトコル番号PT1190-1に従って、標識プローブで試験する。ハイブリダイゼーションおよび洗浄後、ブロットをマウントして、そして-70℃で一晩フィルムに露出し、そしてフィルムを標準的な手順に従って現像する。

【0740】

(実施例4：ポリヌクレオチドの染色体マッピング)

オリゴヌクレオチドプライマーのセットを、配列番号Xの5'末端の配列に従って設計する。このプライマーは、好ましくは約100ヌクレオチドにわたる。次いで、このプライマーセットを、以下のセットの条件下でポリメラーゼ連鎖反応に使用する：95℃で30秒；56℃で1分；70℃で1分。このサイクルを32回反復し、次いで1回、70℃で5分間のサイクルを行う。個々の染色体ま

たは染色体フラグメントを含む体細胞ハイブリッドパネル (B i o s , I n c) に加えて、ヒト、マウス、およびハムスターのDNAを鋳型として使用する。反応物を、8%ポリアクリルアミドゲルまたは3.5%アガロースゲルのいずれかで分析する。染色体マッピングを、特定の体細胞ハイブリッドにおける約100bpのPCRフラグメントの存在によって決定する。

【 0 7 4 1 】

(実施例 5 : ポリペプチドの細菌性発現)

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、実施例1に概説するように、DNA配列の5'および3'末端に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅して挿入フラグメントを合成する。cDNA挿入物を増幅するために使用されるプライマーは、発現ベクターに増幅産物をクローニングするために、B a m H I および X b a I のような制限部位、ならびに、必要ならば、開始/停止コドンを含ましくは含むべきである。例えば、B a m H I および X b a I は、細菌性発現ベクター p Q E - 9 (Q i a g e n , I n c . , C h a t s w o r t h , C A) の制限酵素部位に対応する。このプラスミドベクターは、抗生物質耐性 (A m p ^r) 、細菌の複製起点 (o r i) 、I P T G で調節可能なプロモーター/オペレーター (P / O) 、リボソーム結合部位 (R B S) 、6-ヒスチジンタグ (6 - H i s) 、および制限酵素クローニング部位をコードする。

【 0 7 4 2 】

p Q E - 9 ベクターを B a m H I および X b a I で消化し、そして、増幅されたフラグメントを細菌性 R B S において開始されるリーディングフレームを維持しながら p Q E - 9 ベクターに連結する。次いで、連結混合物を、l a c I リプレッサーを発現し、またカナマイシン耐性 (K a n ^r) を与えるプラスミド p R E P 4 の多重コピーを含む、E . c o l i 株 M 1 5 / r e p 4 (Q i a g e n , I n c .) を形質転換するために使用する。形質転換体を、LBプレート上で生育するそれらの能力によって同定し、そしてアンピシリン/カナマイシン耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを単離し、そして制限分析によって確認する。

【 0 7 4 3 】

所望の構築物を含むクローンを、Amp (1 0 0 μ g / ml) およびKan (2 5 μ g / ml) の両方を補充したLB培地における液体培養で一晩 (O / N) 増殖させる。O / N培養物を、1 : 1 0 0 ~ 1 : 2 5 0 の比で大量培養物に接種するために使用する。細胞を、0 . 4と0 . 6との間の光学密度600 (O . D . $^{\circ}$) まで増殖させる。次いで、IPTG (イソプロピル - B - D - チオガラクトピラノシド) を最終濃度1 mMになるように加える。IPTGは、lac I リプレッサーの不活化により誘導され、P / Oを除去し、遺伝子発現の増加を導く。

【 0 7 4 4 】

細胞を、さらに3 ~ 4時間増殖させる。次いで、細胞を遠心分離 (6 0 0 0 \times gで20分間) によって収集する。細胞ペレットを、カオトロピック剤である6 MグアニジンHCl中に、4℃で3 ~ 4時間攪拌することによって可溶化させる。細胞細片を遠心分離によって取り除き、そしてポリペプチドを含む上清を、ニッケル - ニトリロ三酢酸 (「Ni - NTA」) アフィニティー樹脂カラム (Q I A G E N , I n c . 前出より入手可能) にロードする。6 \times His タグを有するタンパク質は、Ni - NTA樹脂に高い親和性で結合し、そして単純な1工程手順で精製され得る (詳細には、The Q I A e x p r e s s i o n i s t (1 9 9 5) Q I A G E N , I n c . , 前出を参照のこと) 。

【 0 7 4 5 】

手短に言えば、上清を、6 Mグアニジン - HCl、pH 8のカラムにロードし、そのカラムを、最初に10容量の6 Mグアニジン - HCl、pH 8で洗浄し、次いで10容量の6 Mグアニジン - HCl、pH 6で洗浄し、そして最後にポリペプチドを、6 Mグアニジン - HCl、pH 5で溶出する。

【 0 7 4 6 】

次いで、精製したタンパク質を、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) または50 mM 酢酸ナトリウム、pH 6の緩衝液および200 mM NaClに対して透析することにより再生させる。あるいは、タンパク質はNi - NTAカラムに固定化している間に、首尾よく再折畳みされ得る。推奨条件は以下の通りである

: プロテアーゼインヒビターを含む、500 mM NaCl、20% グリセロール、20 mM Tris/HCl pH 7.4 中の6 M~1 M 尿素の直線勾配を使用する再生。再生は1.5時間以上の時間をかけて行うべきである。再生後、タンパク質を250 mM イミダゾールの添加によって溶出させる。イミダゾールを、PBS または50 mM 酢酸ナトリウム pH 6 の緩衝液および200 mM NaCl に対する最終の透析工程によって除去する。精製したタンパク質を、4℃で保存するか、または-80℃で冷凍する。

【0747】

上記の発現ベクターに加えて、本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドに作動可能に連結されたファージオペレーターおよびプロモーターエレメントを含み、pHE4a と呼ばれる発現ベクターを含む (ATCC 受託番号 209645、1998年2月25日に寄託)。このベクターは以下を含む: 1) 選択マーカーとしてのネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、2) E. coli 複製起点、3) T5 ファージプロモーター配列、4) 2つの lac オペレーター配列、5) シャイン-ダルガーノ配列、および6) ラクトースオペロンリプレッサー遺伝子 (laqIq)。複製起点 (oriC) は、pUC19 (LTI, Gaithersburg, MD) に由来する。プロモーター配列およびオペレーター配列を合成的に作製する。

【0748】

NdeI および XbaI、BamHI、XhoI、または Asp718 によってベクターを制限処理し、制限生成物をゲルで泳動し、そしてより大きな方のフラグメント (スタッファー (stuffer) フラグメントは約310塩基対であるべきである) を単離することによって、DNA を pHEa に挿入し得る。DNA 挿入物を、NdeI (5' プライマー) および XbaI、BamHI、XhoI、または Asp718 (3' プライマー) に対する制限部位を有する PCR プライマーを使用して、実施例1に記載のPCRプロトコルに従って生成する。PCR 挿入物を、ゲル精製し、そして適合する酵素で制限処理する。挿入物およびベクターを標準的なプロトコルに従って連結する。

【0749】

操作されたベクターは、上記のプロトコルにおいて、細菌系でタンパク質を発現させるために容易に置換され得る。

【 0 7 5 0 】

(実施例 6 : 封入体からのポリペプチドの精製)

以下の代替的な方法は、ポリペプチドが封入体の形態で存在する場合に、*E. coli* 中で発現されたポリペプチドを精製するために使用され得る。他に指定されない場合には、以下のすべての工程は 4 ~ 10 °C で行われる。

【 0 7 5 1 】

E. coli 発酵の生産期の完了後、細胞培養物を 4 ~ 10 °C に冷却し、そして 15,000 rpm の連続遠心分離 (Heraeus Sepatech) によって細胞を採集する。細胞ペーストの単位重量あたりのタンパク質の予想される収量および必要とされる精製タンパク質の量に基づいて、細胞ペーストの適切な量 (重量による) を、100 mM Tris、50 mM EDTA、pH 7.4 を含む緩衝溶液に懸濁させる。細胞を、高剪断ミキサーを使用して均質な懸濁液に分散させる。

【 0 7 5 2 】

次いで、細胞をマイクロフルイダイザー (microfluidizer) (Microfluidics, Corp. または APV Gaulin, Inc.) に 2 回、4000 ~ 6000 psi で溶液を通すことによって溶解させる。次いでホモジネートを、最終濃度 0.5 M NaCl になるように NaCl 溶液と混合し、続いて 7000 × g で 15 分間遠心分離を行う。得られたペレットを、0.5 M NaCl、100 mM Tris、50 mM EDTA、pH 7.4 を使用して再度洗浄する。

【 0 7 5 3 】

得られた洗浄した封入体を、1.5 M 塩酸グアニジン (GuHCl) で 2 ~ 4 時間可溶化する。7000 × g で 15 分間の遠心分離の後、ペレットを廃棄し、そしてポリペプチドを含む上清を 4 °C で一晩インキュベートしてさらなる GuHCl 抽出を可能にする。

【 0 7 5 4 】

不溶性粒子を除去するための高速遠心分離 (30, 000 × g) に続き、G u H C l 可溶化タンパク質を、G u H C l 抽出物と、50 m M ナトリウム、p H 4. 5、150 m M N a C l、2 m M E D T Aを含む20容量の緩衝液とを、激しい攪拌で迅速に混合することによって、再折畳みさせる。再折畳みした希釈タンパク質溶液を、さらなる精製工程の前の12時間、混合しないで4℃で保つ。

【 0 7 5 5 】

再折畳みされたポリペプチド溶液を清澄にするために、40 m M 酢酸ナトリウム、p H 6. 0で平衡化した、適切な表面積を有する0. 16 μ mメンブレンフィルターを備えるあらかじめ準備した接線濾過ユニット (例えば、F i l t r o n) を使用する。濾過したサンプルを、カチオン交換樹脂 (例えば、P o r o s H S - 50、P e r s e p t i v e B i o s y s t e m s) 上にロードする。このカラムを40 m M 酢酸ナトリウム、p H 6. 0で洗浄し、そして同じ緩衝液中の250 m M、500 m M、1000 m M、および1500 m M N a C lで、段階的な様式で溶出する。溶出液の280 n mにおける吸光度を連続的にモニターする。画分を収集し、そしてS D S - P A G Eによってさらに分析する。

【 0 7 5 6 】

次いでポリペプチドを含む画分をプールし、そして4容量の水と混合する。次いで希釈されたサンプルを、あらかじめ準備した強アニオン (P o r o s H Q - 50、P e r s e p t i v e B i o s y s t e m s) 交換樹脂および弱アニオン (P o r o s C M - 20、P e r s e p t i v e B i o s y s t e m s) 交換樹脂の直列カラムのセットにロードする。カラムを40 m M 酢酸ナトリウム、p H 6. 0で平衡化する。両方のカラムを、40 m M 酢酸ナトリウム、p H 6. 0、200 m M N a C lで洗浄する。次いでC M - 20カラムを10カラム容量の直線勾配 (0. 2 M N a C l、50 m M 酢酸ナトリウム、p H 6. 0から1. 0 M N a C l、50 m M 酢酸ナトリウム、p H 6. 5の範囲) を用いて溶出させる。画分を、溶出液の定常A₂₈₀。モニタリング下で収集する。次いで、(例えば、16% S D S - P A G Eによって決定された) ポリペ

プチドを含む画分をプールする。

【 0 7 5 7 】

得られたポリペプチドは、上記の再折畳みおよび精製工程の後で95%より高い純度を示すはずである。5 μ gの精製タンパク質がロードされる場合、いかなる主たる混在バンドも、クマシーブルー染色した16% SDS-PAGEゲルから観察されないはずである。精製タンパク質はまた、エンドトキシン/LPS混在について試験され得、そして代表的には、LPS含量はLALアッセイに従って、0.1 ng/ml未満である。

【 0 7 5 8 】

(実施例7: バキュロウイルス発現系におけるポリペプチドのクローニングおよび発現)

この実施例において、プラスミドシャトルベクターpA2を使用して、ポリヌクレオチドをバキュロウイルスに挿入し、ポリペプチドを発現する。この発現ベクターは、Autographa californica核多核体ウイルス(AcMNPV)の強力なポリヘドリンプロモーター、続いてBamHI、XbaI、およびAsp718のような簡便な制限部位を含む。シミアンウイルス40(「SV40」)のポリアデニル化部位を、効率的なポリアデニル化のために使用する。組換えウイルスの容易な選択のために、このプラスミドは、同方向の弱いDrosophilaプロモーターの制御下で、E. coli由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子、続いてポリヘドリン遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む。挿入された遺伝子は、クローン化したポリヌクレオチドを発現する生存可能なウイルスを生成する、野生型ウイルスDNAとの細胞媒介性の相同組換えのためのウイルス配列と両方の側で隣接する。

【 0 7 5 9 】

他の多くのバキュロウイルスベクター(例えば、pAc373、pVL941、およびpAcIM1)は、当業者が容易に理解するように、構築物が転写、翻訳、分泌などのために適切に配置されたシグナル(必要とされる場合、シグナルペプチドおよびインフレームなAUGを含む)を提供する限りにおいて、上記のベクターの代わりに使用され得る。このようなベクターは、例えば、Lucko

wら、Virology 170:31-39 (1989) に記載される。

【0760】

具体的には、寄託されたクローンに含まれるcDNA配列を、適切な制限部位および開始/停止コドンを含むプライマーを使用して、実施例1に記載されるPCRプロトコルを使用して増幅させる。天然に存在するシグナル配列を使用して分泌タンパク質を産生する場合、pA2ベクターは第2のシグナルペプチドを必要としない。あるいは、Summersら、「A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures」、Texas Agricultural Experimental Station Bulletin NO. : 1555 (1987) に記載される標準的な方法を用いて、このベクターを、バキュロウイルスリーダー配列を含むように改変し得る (pA2GP)。

【0761】

増幅されたフラグメントを、市販のキット (「GeneClean」、BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.) を使用して、1%アガロースゲルから単離する。次いで、このフラグメントを適切な制限酵素で消化し、そして再び1%アガロースゲル上で精製する。

【0762】

このプラスミドを対応する制限酵素で消化し、そして必要に応じて、当該分野で公知の慣用的な手順を用いて、仔ウシ腸ホスファターゼを用いて脱リン酸し得る。次いで、このDNAを、市販のキット (「GeneClean」BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.) を使用して、1%アガロースゲルから単離する。

【0763】

このフラグメントおよび脱リン酸したプラスミドを、T4 DNAリガーゼを用いて互いに連結する。E. coli HB101細胞またはXL-1 Blue (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) 細胞のような他の適切なE. coli宿主を、連結混合液で形質転換

し、そして培養プレート上に拡げる。このプラスミドを含む細菌を、個々のコロニー由来のDNAを消化し、そしてゲル電気泳動によって消化産物を分析することにより同定する。クローニングしたフラグメントの配列を、DNA配列決定によって確認する。

【 0 7 6 4 】

このポリヌクレオチドを含む5 μ gのプラスミドを、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417 (1987)によって記載されたりポフェクション法を使用して、1.0 μ gの市販の線状化バキュロウイルスDNA (「BaculoGoldTM baculovirus DNA」, Pharmingen, San Diego, CA) と同時トランスフェクトする。1 μ gのBaculoGoldTM ウイルスDNAおよび5 μ gのプラスミドを、50 μ lの無血清グレース培地 (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) を含む、マイクロタイタープレートの滅菌したウェル中で混合する。その後、10 μ lのリポフェクションおよび90 μ lグレース培地を加え、混合し、そして室温で15分間インキュベートする。次いで、トランスフェクション混合液を、無血清のグレース培地1mlを加えた35mm組織培養プレートに播種したSf9昆虫細胞 (ATCC CRL 1711) に滴下する。次いで、このプレートを27℃で5時間インキュベートする。次いで、トランスフェクション溶液をこのプレートから除去し、そして10%ウシ胎仔血清を補充した1mlのグレース昆虫培地を添加する。次いで、培養を27℃で4日間継続する。

【 0 7 6 5 】

4日後上清を収集し、そしてSummersおよびSmith (前出) によって記載されるようにブランクアッセイを行う。「Blue Gal」 (Life Technologies Inc., Gaithersburg) を含むアガロースゲルを使用して、galが発現しているクローン (青色に染色したブランクを生ずる) の容易な同定および単離を可能にする。(この型の「ブランクアッセイ」の詳細な説明はまた、Life Technologies Inc., Gaithersburg, 9-10頁によって頒布される、昆虫細胞培養お

よびバキュロウイルス学のための使用者ガイドの中に見出され得る)。適切なインキュベーションの後、青色に染色したブランクを、マイクロピペッターのチップ(例えば、E p p e n d o r f)で拾う。次いで、組換えウイルスを含む寒天を、200 μ lのグレース培地を含む微小遠心分離チューブ中で再懸濁し、そして組換えバキュロウイルスを含む懸濁液を使用して、35 mmディッシュに播種したS f 9細胞を感染させる。4日後、これらの培養ディッシュの上清を採集し、次いで4℃に貯蔵する。

【 0 7 6 6 】

ポリペプチドの発現を確認するために、10%熱非働化FBSを補充したグレース培地中で、S f 9細胞を増殖させる。この細胞を、約2の感染効率(「M O I」)で、このポリヌクレオチドを含む組換えバキュロウイルスで感染させる。放射性標識したタンパク質を所望する場合には、6時間後に培地を除去し、そしてメチオニンおよびシステインを含まないS F 9 0 0 I I培地(L i f e T e c h n o l o g i e s I n c . , R o c k v i l l e , M Dから入手可能)に置き換える。42時間後、5 μ C iの³⁵S-メチオニンおよび5 μ C iの³⁵S-システイン(A m e r s h a mから入手可能)を添加する。細胞をさらに16時間インキュベートし、次いで遠心分離によって採集する。上清中のタンパク質ならびに細胞内タンパク質を、S D S - P A G Eによって、次いでオートラジオグラフィーによって(放射性標識した場合)分析する。

【 0 7 6 7 】

精製タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列の微量配列決定法を使用して、産生されたタンパク質のアミノ末端配列を決定し得る。

【 0 7 6 8 】

(実施例8：哺乳動物細胞におけるポリペプチドの発現)

本発明のポリペプチドを、哺乳動物細胞において発現させ得る。代表的な哺乳動物発現ベクターは、mRNAの転写の開始を媒介するプロモーターエレメント、タンパク質コード配列、および転写の終結および転写物のポリアデニル化に必要なシグナルを含む。さらなるエレメントは、エンハンサー、コザック(K o z a k)配列、ならびに、RNAスプライシングのためのドナー部位およびアクセ

プター部位に隣接する介在配列を含む。非常に効率的な転写は、SV40由来の初期および後期プロモーター、レトロウイルス（例えばRSV、HTLV I、H I V I）由来の長末端反復（LTR）、およびサイトメガロウイルス（CMV）の初期プロモーターを用いて達成される。しかし、細胞内エレメント（例えば、ヒトアクチンプロモーター）もまた、使用され得る。

【 0 7 6 9 】

本発明を実施する際の使用に適切な発現ベクターは、例えば、pSVLおよびpMSG（Pharmacia, Uppsala, Sweden）、pRSVcat（ATCC 37152）、pSV2dhfr（ATCC 37146）、pBC12MI（ATCC 67109）、pCMVSPORT2.0、ならびにpCMVSPORT3.0のようなベクターを含む。使用され得る哺乳動物宿主細胞としては、ヒトのHeLa細胞、293細胞、H9細胞およびJurkat細胞、マウスのNIH3T3細胞およびC127細胞、Cos1細胞、Cos7細胞およびCV1細胞、ウズラのQC1-3細胞、マウスのL細胞、およびチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞が挙げられる。

【 0 7 7 0 】

あるいは、ポリペプチドは、染色体に組み込まれたポリヌクレオチドを含む、安定な細胞株中で発現され得る。dhfr、gpt、ネオマイシン、ハイグロマイシンのような選択マーカーを用いる同時トランスフェクションは、トランスフェクトされた細胞の同定および単離を可能にする。

【 0 7 7 1 】

トランスフェクトされた遺伝子はまた、大量のコードされたタンパク質を発現するために増幅され得る。DHFR（ジヒドロ葉酸レダクターゼ）マーカーは、目的の遺伝子の数百または数千さえものコピーを有する細胞株の開発に有用である（例えば、Altら、J. Biol. Chem. 253:1357-1370（1978）；Hamlinら、Biochem. et Biophys. Acta、1097:107-143（1990）；Pageら、Biotechnology、9:64-68（1991）を参照のこと）。別の有用な選択マーカーは、酵素グルタミンシンターゼ（GS）である（Murphyら、Bioc

hem J. 227: 277-279 (1991); Bebbingtonら、Bio/Technology、10: 169-175 (1992))。これらのマーカーを使用して、哺乳動物細胞を選択培地中で増殖させ、そしてもっとも高い耐性を有する細胞を選択する。これらの細胞株は、染色体に組み込まれた、増幅した遺伝子を含む。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) および NSO 細胞は、タンパク質の産生のためにしばしば使用される。

【0772】

プラスミド pSV2-dhfr (ATCC 受託番号 37146) の誘導体である、発現ベクター pC4 (ATCC 受託番号 209646) および pC6 (ATCC 受託番号 209647) は、ラウス肉腫ウイルス (Cullenら、Molecular and Cellular Biology、438-447 (1985年3月)) の強力なプロモーター (LTR)、および CMV-エンハンサー (Boshartら、Cell 41: 521-530 (1985)) のフラグメントを含む。例えば、BamHI、XbaI、および Asp718 の制限酵素切断部位を有するマルチプルクローニングサイトは、目的の遺伝子のクローニングを容易にする。このベクターはまた、3' イントロン、ラットプレプロインスリン遺伝子のポリアデニル化シグナルおよび終結シグナル、ならびに、SV40 初期プロモーターの制御下にあるマウス DHFR 遺伝子を含む。

【0773】

具体的には、例えば、プラスミド pC6 を、適切な制限酵素を用いて消化し、次いで当該分野で公知の手順によって、仔ウシ腸ホスファターゼ (phosphatase) を使用して脱リン酸する。次いで、ベクターを 1% アガロースゲルから単離する。

【0774】

本発明のポリヌクレオチドは、必要ならば、適切な制限部位および開始/停止コドンを含むプライマーを使用して、実施例 1 に概説するプロトコルに従って増幅される。分泌が必要な場合、このベクターは、異種シグナル配列を含むように改変され得る (例えば、WO 96/34891 を参照のこと)。

【0775】

増幅フラグメントを、市販のキット（「GeneClean」、BIO 101 Inc.、La Jolla, Ca.）を使用して、1%アガロースゲルから単離する。次いで、このフラグメントを、適切な制限酵素で消化し、そして再び1%アガロースゲル上で精製する。

【0776】

次いで、増幅フラグメントを同じ制限酵素で消化し、そして1%アガロースゲル上で精製する。次いで、単離されたフラグメントおよび脱リン酸したベクターを、T4 DNAリガーゼで連結する。次いで、E. coli HB101細胞またはXL-1 Blue細胞を形質転換し、そしてプラスミドpC6に挿入されたフラグメントを含む細菌を、例えば、制限酵素分析を用いて同定する。

【0777】

活性なDHFR遺伝子を欠損するチャイニーズハムスター卵巣細胞を、トランスフェクションに使用する。5 μ gの発現プラスミドpC6を、リポフェクチンを用いて、0.5 μ gのプラスミドpSVneoと同時トランスフェクトする（Feignerら、前出）。プラスミドpSV2-neoは、優性で選択マーカーであるところの、G418を含む抗生物質の群に対する耐性を付与する酵素をコードするTn5由来のneo遺伝子を含む。この細胞を、1mg/mlのG418を補充した α マイナスMEMに播種する。2日後、この細胞をトリプシン処理し、そして10、25、または50ng/mlのメトトレキサートおよび1mg/mlのG418を補充した α マイナスMEM中のハイブリドーマクローニングプレート（Greiner, Germany）中に播種する。約10～14日後、単一のクローンをトリプシン処理し、次いで異なる濃度のメトトレキサート（50nM、100nM、200nM、400nM、800nM）を使用して、6ウェルのペトリ皿または10mlのフラスコに播種する。次いで、最高濃度のメトトレキサートで増殖するクローンを、さらに高い濃度のメトトレキサート（1 μ M、2 μ M、5 μ M、10mM、20mM）を含む新たな6ウェルプレートに移す。同じ手順を、100～200 μ Mの濃度で増殖するクローンが得られるまで繰り返す。所望の遺伝子産物の発現を、例えば、SDS-PAGEおよびウエスタンブロットによって、または逆相HPLC分析によって分析する。

【 0 7 7 8 】

(実施例 9 : タンパク質融合物)

本発明のポリペプチドは、好ましくは、他のタンパク質に融合される。これらの融合タンパク質は、種々の適用について使用され得る。例えば、本発明のポリペプチドの、Hisタグ、HAタグ、プロテインA、IgGドメイン、およびマルトース結合タンパク質への融合は、精製を容易にする（実施例5を参照のこと；EP A 394, 827；Trauneckerら、Nature 331：84-86（1988）もまた参照のこと）。これらのポリペプチドはまた、分泌または細胞内往来（*trafficking*）（例えば、KDEL）を促進するために、異種ポリペプチド配列に融合され得る。さらに、IgG-1、IgG-3、およびアルブミンへの融合は、インビボでの半減期を増大させる。本発明のポリペプチドに融合した核局在化シグナルは、タンパク質を特定の細胞下（*subcellular*）局在に標的化し得る。一方、共有結合ヘテロダイマーまたはホモダイマーは、融合タンパク質の活性を増大または減少させ得る。融合タンパク質はまた、1つより多い機能を有するキメラ分子を作製し得る。最後に、融合タンパク質は、非融合タンパク質と比較して、融合タンパク質の可溶性および／または安定性を増大させ得る。上記の融合タンパク質の全ての型は、ポリペプチドのIgG分子への融合を概説する以下のプロトコル、または実施例5に記載されるプロトコルを改変することによって作製され得る。

【 0 7 7 9 】

簡単には、IgG分子のヒトFc部分は、以下に記載の配列の5'および3'末端にわたるプライマーを使用してPCR増幅され得る。これらのプライマーはまた、発現ベクター（好ましくは、哺乳動物発現ベクター）へのクローニングを容易にする都合の良い制限酵素部位および必要であれば開始／終止コドンを含むべきである。

【 0 7 8 0 】

例えば、pC4（受託番号第209646号）が使用される場合、ヒトFc部分は、BamHIクローニング部位に連結され得る。3' BamHI部位が破壊されるべきであることに注意のこと。次に、ヒトFc部分を含有するベクターが

、B a m H I によって再び制限処理され、ベクターを線状化し、そして実施例 1 に記載する P C R プロトコルによって単離された本発明のポリヌクレオチドが、この B a m H I 部位に連結される。ポリヌクレオチドは、終止コドンなしにクローニングされ、そうでなければ、融合タンパク質は産生されないことに注意すること。

【 0 7 8 1 】

天然に存在するシグナル配列が分泌タンパク質を産生するために使用される場合、p C 4 は、第二のシグナルペプチドを必要としない。あるいは、天然に存在するシグナル配列が使用されない場合、ベクターは、異種シグナル配列を含むように改変され得る（例えば、W O 9 6 / 3 4 8 9 1 を参照のこと）。

【 0 7 8 2 】

【 化 1 】

ヒト IgG Fe領域:

GGGATCCGGAGGCCAAATCTTCTGACAAACTCACACATGCCCAACCGTGCCCAAGCACCTGAATTCTC
 GAGGTGCACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCCGGAC
 TCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGACGTAAAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
 TACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAACAGC
 ACGTACCGTGTGTCAGCGTCTCTCAACCGTCTGCCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
 AGTGCAAGGTCTCCCAACAAGGCCCTCCCAACCCCAATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG
 GCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACCCCTGCCCAATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCCAG
 GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTATCCAAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
 ATGGGACCGCGAGAACAACTACAAGACCAACCGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCTCTTC
 CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
 TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGACGAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
 GTGCGACGGCCGCGACTCTAGAGGAT (配列番号:1)

(実施例 10 : ポリペプチドの処方) -

本発明はまた、被験体に有効量の治療剤を投与することにより疾患または障害
 (例えば、本明細書中に開示される疾患または障害の任意の1つ以上のような)
 を処置および／または予防する方法を提供する。治療剤により、薬学的に受容可
 能なキャリア型(例えば、滅菌キャリア)と組み合わせた、本発明のポリヌクレ
 オチドまたはポリペプチド(フラグメントおよび改変体を含む)、そのアゴニス
 トまたはアンタゴニスト、および／またはそれらに対する抗体を意味する。

【 0 7 8 3 】

ポリペプチド組成物を、個々の患者の臨床状態（特に、分泌ポリペプチド単独処置の副作用）、送達部位、投与方法、投与計画および当業者に公知の他の因子を考慮に入れ、医療実施基準（good medical practice）を遵守する方式で処方および投薬する。従って、本明細書において目的とする「有効量」は、このような考慮により決定される。

【 0 7 8 4 】

一般的提案として、用量当り、非経口的に投与されるポリペプチドの総薬学的有効量は、患者体重の、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ ~ $10 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ の範囲にあるが、上記のようにこれは治療的裁量に委ねられる。さらに好ましくは、このホルモンについて、この用量は、少なくとも $0.01 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、そして最も好ましくはヒトに対して約 $0.01 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ と約 $1 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ との間である。連続投与する場合、代表的には、ポリペプチドを約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{時間}$ ~ 約 $50 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{時間}$ の投薬速度で1日に1~4回の注射かまたは連続皮下注入（例えばミニポンプを用いる）のいずれかにより投与する。静脈内用バッグ溶液もまた使用し得る。変化を観察するために必要な処置期間および応答が生じる処置後の間隔は、所望の効果に応じて変化するのである。

【 0 7 8 5 】

本発明のポリペプチドを含む薬学的組成物を、経口的、直腸内、非経口的、槽内（intracisternally）、腔内、腹腔内、局所的（粉末、軟膏、ゲル、点滴剤、または経皮パッチによるなど）、頬側（buccally）、あるいは経口または鼻腔スプレーとして投与する。「薬学的に受容可能なキャリア」とは、非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、被包材または任意の型の製剤補助剤をいう。本明細書で用いる用語「非経口的」とは、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内の注射および注入を含む投与の様式をいう。

【 0 7 8 6 】

ポリペプチドはまた、徐放性システムにより適切に投与される。徐放性組成物の適切な例は、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの成形品の形態の半透

過性ポリマーマトリックスを包含する。徐放性マトリックスとしては、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号、EP58,481）、L-グルタミン酸およびγ-エチル-L-グルタメートのコポリマー（Sidmanら、Biopolymers 22:547-556（1983））、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）（Langerら、J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277（1981））、およびLanger, Chem. Tech. 12:98-105（1982））、エチレンビニルアセテート（R. Langerら）またはポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸（EP133,988）が挙げられる。徐放性組成物はまた、リボソームに封入されたポリペプチドを包含する。分泌ポリペプチドを含有するリボソームは、それ自体が公知である方法により調製される：DE3,218,121；Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692（1985）；Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034（1980）；EP52,322；EP36,676；EP88,046；EP143,949；EP142,641；日本国特許出願第83-118008号；米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号；ならびにEP第102,324号。通常、リボソームは、小さな（約200～800オングストローム）単層状型であり、脂質含有量は、約30モル%コレステロールよりも多く、選択された割合が、最適分泌ポリペプチド治療のために調整される。

【0787】

非経口投与のために、1つの実施態様において、一般に、ポリペプチドは、それを所望の程度の純度で、薬学的に受容可能なキャリア、すなわち、用いる投薬量および濃度でレシピエントに対して毒性がなく、かつ処方物の他の成分と適合するものと、単位投薬量の注射可能な形態（溶液、懸濁液または乳濁液）で混合することにより処方される。例えば、この処方物は、好ましくは、酸化剤、およびポリペプチドに対して有害であることが知られている他の化合物を含まない。

【0788】

一般に、ポリペプチドを液体キャリアまたは微細分割固体キャリアあるいはそ

の両方と均一および緊密に接触させて処方物を調製する。次に、必要であれば、生成物を所望の処方物に成形する。好ましくは、キャリアは、非経口的キャリアであり、より好ましくはレシビエントの血液と等張である溶液である。このようなキャリアビヒクルの例としては、水、生理食塩水、リンゲル溶液およびデキストロース溶液が挙げられる。不揮発性油およびオレイン酸エチルのような非水性ビヒクルもまた、リポソームと同様に本明細書において有用である。

【 0 7 8 9 】

キャリアは、等張性および化学的安定性を増強する物質のような微量の添加剤を適切に含有する。このような物質は、用いる投薬量および濃度でレシビエントに対して毒性がなく、そしてこのような物質としては、リン酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、酢酸および他の有機酸またはその塩類のような緩衝剤；アスコルビン酸のような抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド（例えば、ポリアルギニンまたはトリペプチド）；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはアルギニンのようなアミノ酸；セルロースまたはその誘導体、ブドウ糖、マンノースまたはデキストリンを含む、単糖類、二糖類、および他の炭水化物；EDTAのようなキレート剤；マンニトールまたはソルビトールのような糖アルコール；ナトリウムのような対イオン；および／またはポリソルベート、ポロキサマーもしくはPEGのような非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【 0 7 9 0 】

ポリペプチドは、代表的には約0.1mg/ml～100mg/ml、好ましくは1～10mg/mlの濃度で、約3～8のpHで、このようなビヒクル中に処方される。前記の特定の賦形剤、キャリアまたは安定化剤を使用することにより、ポリペプチド塩が形成されることが理解される。

【 0 7 9 1 】

治療的投与に用いられる任意のポリペプチドは無菌状態であり得る。滅菌濾過膜（例えば0.2ミクロンメンブレン）で濾過することにより無菌状態は容易に達成される。一般に、治療用ポリペプチド組成物は、滅菌アクセスポートを有す

る容器、例えば、皮下用注射針で穿刺可能なストッパー付の静脈内用溶液バッグまたはバイアルに配置される。

【 0 7 9 2 】

ポリペプチドは、通常、単位用量または複数用量容器、例えば、密封アンプルまたはバイアルに、水溶液または再構成するための凍結乾燥処方物として貯蔵される。凍結乾燥処方物の例として、10 ml のバイアルに、滅菌濾過した1% (w/v) ポリペプチド水溶液5 ml を充填し、そして得られる混合物を凍結乾燥する。凍結乾燥したポリペプチドを注射用静菌水を用いて再構成して注入溶液を調製する。

【 0 7 9 3 】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の1つ以上の成分を満たした一つ以上の容器を備える薬学的バックまたはキットを提供する。医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関が定めた形式の通知が、このような容器に付属し得、この通知は、ヒトへの投与に対する製造、使用または販売に関する政府機関による承認を表す。さらに、本発明のポリペプチドを他の治療用化合物と組み合わせて使用し得る。

【 0 7 9 4 】

本発明の治療剤は、単独で、またはアジュバントと組み合わせて投与され得る。本発明の治療剤とともに投与され得るアジュバントとしては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：ミョウバン、ミョウバン+デオキシコール酸 (Immuno Ag)、MTP-PE (Biocine Corp.)、QS21 (Genentech, Inc.)、BCG (例えば、THERACYS (登録商標))、MPL、および *Corynebacterium parvum* の生育不能な調製物。特定の実施形態において、本発明の治療剤は、ミョウバンと組み合わせて投与される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、QS-21 と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得るさらなるアジュバントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：モノホスホリル脂質免疫調節剤、AdjuVax 100a、QS-21、QS-18、CRL 1005、アルミニウム塩、MF-59、および Virosomal アジ

ュバント技術。本発明の治療剤とともに投与され得るワクチンとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：MMR（麻疹、流行性耳下腺炎、風疹）、ポリオ（polio）、水痘、破傷風／ジフテリア、A型肝炎、B型肝炎、B型インフルエンザ、百日咳（whooping cough）、肺炎、インフルエンザ、ライム病、ロタウイルス、コレラ、黄熱病、日本脳炎、ポリオ（poliomyelitis）、狂犬病、腸チフス、および百日咳（pertussis）に対する防御に指向するワクチン。組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時にもしくは並行して；または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わせられた薬剤が治療混合物としてともに投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に（例えば、同じ個体へ別々の静脈ラインを通じてのように）投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第1に、続いて第2に投与される化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。

【0795】

本発明の治療剤は、単独で、または他の治療的薬剤と組み合わせで投与され得る。本発明の治療剤と組合せて投与され得る治療的薬剤としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：化学療法剤、抗生物質、ステロイド性および非ステロイド性の抗炎症剤、従来の免疫療法剤、および／または以下に記載される治療的処置。組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時にもしくは並行して；または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わせられた薬剤が、治療混合物としてともに投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に（例えば、同じ個体へ別々の静脈ラインを通じてのように）投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第1に、続いて第2に投与される化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。

【0796】

1つの実施形態において、本発明の治療剤は、抗凝血剤と組み合わせで投与される。本発明の組成物と共に投与され得る抗凝血剤としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：ヘパリン、低分子量ヘパリン、ワルファリンナトリウム

(例えば、COUMADIN (登録商標))、ジクマロール、4-ヒドロキシクマリン、アニシンジオン (例えば、MIRADONTM)、アセノクマロール (例えば、ニクマロン、SINTHROMETM)、インダン-1, 3-ジオン、フェンブロクーモン (例えば、MARCUMARTM)、エチルビスクマセテート (ethyl biscoumacetate) (例えば、TROMEXANTM)、およびアスピリン。特定の実施形態において、本発明の組成物は、ヘパリンおよび/またはワルファリンと組み合わせて投与される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、ワルファリンと組み合わせて投与される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、ワルファリンおよびアスピリンと組み合わせて投与される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、ヘパリンと組み合わせて投与される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、ヘパリンおよびアスピリンと組み合わせて投与される。

【0797】

別の実施形態において、本発明の治療剤は、血栓溶解剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物と共に投与され得る血栓溶解剤としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：プラスミノゲン、ライスプラスミノゲン (lysp lasminogen)、 α 2-抗プラスミン、ストレプトキナーゼ (例えば、KABIKINASETM)、抗レスプレイス (antiresplase) (例えば、EMINASETM)、組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA、アルテベイス (altevasse)、ACTIVASETM)、ウロキナーゼ (例えば、ABBOKINASETM)、サウルプレイス (sauruplase) (プロウロキナーゼ、単鎖ウロキナーゼ) およびアミノカブロン酸 (例えば、AMICARTM)。特定の実施形態において、本発明の組成物は、組織プラスミノゲンアクチベーターおよびアスピリンと組み合わせて投与される。

【0798】

別の実施形態において、本発明の治療剤は、抗血小板剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物と共に投与され得る抗血小板剤としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：アスピリン、ジピリダモール (例えば、PERSANTINETM)、およびチクロピジン (例えば、TICLIDTM)。

【 0 7 9 9 】

特定の実施形態において、本発明の治療剤との組み合わせにおいて抗凝血剤、血栓溶解剤および／または抗血小板剤の使用は、血栓症、動脈血栓症、静脈血栓症、血栓塞栓症、肺塞栓症、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、一過性脳虚血発作、不安定狭心症の予防、診断および／または処置が考えられる。特定の実施形態において、本発明の治療剤との組み合わせにおける抗凝血剤、血栓溶解剤および／または抗血小板剤の使用は、血管形成手順に伴い得るような手術周辺の血栓症の危険を軽減するために、非リウマチ性心房細動を含む心房細動を有する患者における発作の危険を軽減するために、人工心臓弁および／または僧帽弁疾患に関連する塞栓症の危険を軽減するために、伏在性の移植片の閉塞の予防が考えられる。単独または抗血小板薬剤、抗凝固薬剤および／または血栓溶解薬剤と組み合わせにおける本発明の治療剤の他の使用としては、体外装置（例えば、脈管内カニューレ、血液透析の患者における脈管アクセスシャント、血液透析機、および心肺バイパス機）における閉塞の予防が挙げられるが、それらに限定されない。

【 0 8 0 0 】

特定の実施形態において、本発明の治療剤は、抗レトロウイルス薬剤、ヌクレオシド／ヌクレオチド逆転写酵素インヒビター（NRTI）、非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター（NNRTI）、および／またはプロテアーゼインヒビター（PI）と組み合わせて投与される。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得るNRTIとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：RETROVIRTM（ジドブジン／AZT）、VIDEXTM（ジダノシン／ddI）、HIVIDTM（ザルシタピン／ddC）、ZERITTM（スタブジン／d4T）、EPIVIRTM（ラミブジン／3TC）、およびCOMBIVIRTM（ジドブジン／ラミブジン）。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得るNNRTIとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：VIRAMUNETM（ネビラピン）、RESCRIPTORTM（デラビルジン）、およびSUSTIVATM（エファビレンズ）。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得るプロテアーゼインヒビターとしては、以下が挙げられるが、これらに限定

されない：CRIXIVANTM（インディナビル（indinavir））、NORVIRTM（リトナビル（ritonavir））、INVIRASETM（サキナビル（saquinavir））、およびVIRACEPTTM（ネルフィナビル（nefinavir））。特定の実施形態において、抗レトロウイルス薬剤、ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、および／またはプロテアーゼインヒビターは、AIDSを処置するため、および／またはHIV感染を予防もしくは処置するために、本発明の治療剤との任意の組み合わせで使用され得る。

【 0 8 0 1 】

さらなるNRTIとしては、以下が挙げられる：LODENOSINETM（F-ddA；酸安定性アデノシンNRTI；Triangle/Abbott；COVIRACILTM（エムトリシタビン（emtricitabine）／FTC；ラミブジン（lamivudine）（3TC）と構造的に関連するが、インビトロにおいて3～10倍強い活性を有する；Triangle/Abbott）；dOTC（BCH-10652，同様に、ラミブジンと構造的に関連するが、ラミブジン耐性分離菌のかなりの部分に対する活性を有する；Biochem Pharma）；Adefovir（FDAによって、抗HIV治療についての認可を拒絶された；Gilead Sciences）；PREVEON（登録商標）（Adefovir Dipivoxil，アデノフォビル（adefovir）の活性なプロドラッグ；その活性形態はPMEA-ppである）；TENOFOVIRTM（ビス-POC PMPA，PMPAプロドラッグ；Gilead）；DAPD/DXG（DAPDの活性な代謝産物；Triangle/Abbott）；D-D4FC（3TCと関連，AZT/3TC-耐性ウイルスに対する活性を有する）；GW420867X（Glaxo Wellcome）；ZIAGENTM（アバカビル（abacavir）／159U89；Glaxo Wellcome Inc.）；CS-87（3'アジド-2'，3'-ジデオキシウリジン；WO 99/66936）；ならびに、β-L-FD4Cおよびβ-L-FddCのS-アシル-2-チオエチル（SATE）-保有プロドラッグ形態（WO 98/17281）。

【 0 8 0 2 】

さらなるNNRTIとしては、以下が挙げられる：COACTINONTM（Emivirine／MKC-442，HEPTクラスの強力なNNRTI；Triangle／Abbott）；CAPRAVIRINETM（AG-1549／S-1153，K103N変異を含むウイルスに対して活性を有する、次世代のNNRTI；Agouron）；PNU-142721（その前駆体デラビルジン（delavirdine）よりも20～50倍高い活性を有し、そしてK103N変異体に対して活性である；Pharmacia & Upjohn）；DPC-961およびDPC-963（エファビレンツ（efavirenz）の第二世代誘導体，K103N変異を有するウイルスに対して活性であるように設計された；DuPont）；GW-420867X（HBY097よりも25倍高い活性を有し、そしてK103N変異体に対して活性である；Glaxo Wellcome）；CALANOLIDE A（ラテックス樹木由来の天然に存在する因子；Y181CおよびK103N変異のいずれかまたは両方を含むウイルスに対して活性）；ならびに、Propolis（WO 99／49830）。

【 0 8 0 3 】

さらなるプロテアーゼインヒビターとしては以下が挙げられる：LOPINAVIRTM（ABT378／r；Abbott Laboratories）；BMS-232632（アザペプチド；Bristol-Myers Squibb）；TIPRANAVIRTM（PNU-140690，非ペプチド性（non-peptidic）ジヒドロピロン；Pharmacia & Upjohn）；PD-178390（非ペプチド性ジヒドロピロン；Parke-Davis）；BMS 232632（アザペプチド；Bristol-Myers Squibb）；L-756, 423（インディナビル（indinavir）のアナログ；Merck）；DMP-450（サイクリック尿素化合物；Avid & DuPont）；AG-1776（プロテアーゼインヒビター耐性ウイルスに対してインビトロで活性を有するペプチド模倣物；Agouron）；VX-175／GW-433908（アンブレナビル（amprenavir）のホ

スフェートプロドラッグ ; Vertex & Glaxo Wellcome) ;
CGP 61755 (Ciba) ; および AGENERASETM (アンブレナビル (amprenavir) ; Glaxo Wellcome Inc.) .

【 0 8 0 4 】

さらなる抗レトロウイルス薬剤としては、融合インヒビター／gp41結合剤が挙げられる。融合インヒビター／gp41結合剤としては、T-20 (その休止状態においてgp41に結合し、そしてフソジェニック (fusogenic) 状態への形質転換を妨げる HIV gp41膜貫通タンパク質の外部ドメインの残基643～678由来のペプチド ; Trimeris) および T-1249 (第二世代の融合インヒビター ; Trimeris) が挙げられる。

【 0 8 0 5 】

さらなる抗レトロウイルス薬剤としては、融合インヒビター／ケモカインレセプターアンタゴニストが挙げられる。融合インヒビター／ケモカインレセプターアンタゴニストとしては、以下が挙げられる : CXCR4アンタゴニスト (例えば、AMD 3100 (バイサイクラム (bicyclam)) , SDF-1 およびそのアナログ、ならびに ALX40-4C (カチオン性ペプチド) , T22 (18アミノ酸のペプチド ; Trimeris) ならびに T22アナログである T134 および T140) ; CCR5アンタゴニスト (例えば、RANTES (9-68) , AOP-RANTES, NNY-RANTES, および TAK-779) ; ならびに CCR5 / CXCR4アンタゴニスト (例えば、NSC 651016 (ジスタマイシンアナログ) 。 CCR2B, CCR3, および CCR6アンタゴニストもまた含まれる。ケモカインレセプターアゴニスト (例えば、RANTES, SDF-1, MIP-1 α , MIP-1 β など) もまた融合を阻害し得る。

【 0 8 0 6 】

さらなる抗レトロウイルス薬剤は、インテグラーゼインヒビターを含む。インテグラーゼインヒビターとしては、以下が挙げられる : ジカフェオイルキナ (DFQA) 酸 (dicaffeoylquinic (DFQA) acids) ; レーチコリ酸 (L-chicoric acid) (ジカフェオイル酒石 (DCT

A) 酸) ; キナリザリン (q u i n a l i z a r i n ; Q L C) および関連のアントラキノン ; Z I N T E V I R TM (A R 1 7 7 、 真のインテグラーゼインヒビターではなく、細胞表面で恐らく作用するオリゴヌクレオチド ; A r o n d e x) ; ならびに W O 9 8 / 5 0 3 4 7 に開示されるようなナフトール。

【 0 8 0 7 】

さらなる抗レトロウイルス薬剤としては、以下が挙げられる : ヒドロキシ尿素様化合物 (例えば、B C X - 3 4 (プリンヌクレオシドホスホリラーゼインヒビター ; B i o c r y s t)) ; リボヌクレオチドレダクターゼインヒビター (例えば、D I D O X TM (M o l e c u l e s f o r H e a l t h)) ; イノシンモノホスフェートデヒドロゲナーゼ (I M P D H) インヒビター (例えば、V X - 4 9 7 (V e r t e x)) ; ならびにマイコフォリック酸 (m y c o p h o l i c a c i d) (例えば、C e l l C e p t (マイコフェノラートモフェチル (m y c o p h e n o l a t e m o f e t i l) ; R o c h e)) 。

【 0 8 0 8 】

さらなる抗レトロウイルス薬剤としては、以下が挙げられる : ウイルスインテグラーゼのインヒビター、ウイルスゲノム核転座のインヒビター (例えば、アリーレンビス (メチルケトン) 化合物) ; H I V 侵入のインヒビター (例えば、A O P - R A N T E S , N N Y - R A N T E S , R A N T E S - I g G 融合タンパク質、R A N T E S およびグリコサミノグリカン (G A G) の可溶性複合体、および A M D - 3 1 0 0) ; ヌクレオカプシドジンクフィンガーインヒビター (例えば、ジチアン (d i t h i a n e) 化合物) ; H I V T a t および R e v の標的 ; ならびに薬剤エンハンサー (p h a r m a c o e n h a n c e r) (例えば、A B T - 3 7 8) 。

【 0 8 0 9 】

他の抗レトロウイルス治療剤および補助治療剤としては、以下が挙げられる : サイトカインおよびリンホカイン (例えば、M I P - 1 α , M I P - 1 β , S D F - 1 α , I L - 2 , P R O L E U K I N TM (アルデスロイキン (a l d e s l e u k i n) / L 2 - 7 0 0 1 ; C h i r o n) , I L - 4 , I L - 1 0 , I L - 1 2 , および I L - 1 3) ; インターフェロン (例えば、I F N - α 2 a)

; TNFs, NF κ B, GM-CSF, M-CSF, および IL-10 のアンタゴニスト; 免疫活性を調節する薬剤 (例えば、シクロスポリンおよびプレドニゾン); ワクチン、例えば、RemuneTM (HIV 免疫原), APL 400-003 (Apolion), 組換え gp120 およびフラグメント, 二価 (B/E) 組換えエンベロープ糖タンパク質, rgp120CM235, MN rgp120, SF-2 rgp120, gp120/可溶性 CD4 複合体, Delta JR-FL タンパク質, 不連続 gp120 C3/C4 ドメイン由来の分枝合成ペプチド, 融合能を有する免疫原, ならびに Gag, Pol, Nef, および Tat ワクチン; 遺伝子に基づく治療、例えば、遺伝的抑制エレメント (GSE; WO 98/54366), およびイントラカイン (intrakine) (遺伝子改変された CCケモカイン (ERへと標的化されて、新たに合成された CCR5 の表面発現をブロックする (Yangら, PNAS 94:11567-72 (1997); Chenら, Nat. Med. 3:1110-16 (1997))); 抗体、例えば、抗 CXCR4 抗体 12G5, 抗 CCR5 抗体 2D7, 5C7, PA8, PA9, PA10, PA11, PA12, および PA14, 抗 CD4 抗体 Q4120 および RPA-T4, 抗 CCR3 抗体 7B11, 抗 gp120 抗体 17b, 48d, 447-52D, 257-D, 268-D および 50.1, 抗 Tat 抗体, 抗 TNF- α 抗体, およびモノクローナル抗体 33A; アリール炭化水素 (AH) レセプターアゴニストおよびアンタゴニスト、例えば、TCDD, 3, 3', 4, 4', 5-ベンタクロロビフェニル, 3, 3', 4, 4'-テトラクロロビフェニル, および α -ナフトフラボン (WO 98/30213); ならびに、抗酸化剤、例えば、 γ -L-グルタミル-L-システインエチルエステル (γ -GCE; WO 99/56764)。

【0810】

さらなる実施形態では、本発明の治療剤は、抗ウイルス薬剤と組み合わせて投与される。本発明の治療剤と共に投与され得る抗ウイルス薬剤としては、アシクロビル、リバビリン、アマンタジン、およびレマンチジン (remantidine) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0811】

他の実施形態では、本発明の治療剤は、抗日和見感染症薬剤と組み合わせて投与され得る。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得る抗日和見感染症薬剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLETM、DAPSONETM、PENTAMIDINETM、ATOVAQUONETM、ISONIAZIDTM、RIFAMPINTM、PYRAZINAMIDETM、ETHAMBUTOLTM、RIFABUTINTM、CLARITHROMYCINTM、AZITHROMYCINTM、GANCICLOVIRTM、FOSCARNETTM、CIDOFOVIRTM、FLUCONAZOLETM、ITRACONAZOLETM、KETCONAZOLETM、ACYCLOVIRTM、FAMCICLOVIRTM、PYRIMETHAMINETM、LEUCOVORINTM、NEUPOGENTM（フィルグラスチム（filgrastim）／G-CSF）、および LEUKINETM（サルグラモスチン（sargramostim）／GM-CSF）。特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見 *Pneumocystis carinii* 肺炎感染を予防的に処置または予防するために、TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLETM、DAPSONETM、PENTAMIDINETM、および／または ATOVAQUONETM との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見 *Mycobacterium avium* 複合感染を予防的に処置または予防するために、ISONIAZIDTM、RIFAMPINTM、PYRAZINAMIDETM、および／または ETHAMBUTOLTM との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見 *Mycobacterium tuberculosis* 感染を予防的に処置または予防するために、RIFABUTINTM、CLARITHROMYCINTM、および／または AZITHROMYCINTM との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見サイトメガロウイルス感染を予防的に処置または予防するために、GANCICLOVIRTM、FOSCARNETTM、および／または CIDOFOVIRTM との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態

において、本発明の治療剤は、日和見真菌感染を予防的に処置または予防するために、FLUCONAZOLETM、ITRACONAZOLETM、および／またはKETOCONAZOLETMとの任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見単純ヘルペスウイルスI型および／またはII型感染を予防的に処置または予防するために、ACYCLOVIRTMおよび／またはFAMCICOLVIRTMとの任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見Toxoplasma gondii感染を予防的に処置または予防するために、PYRIMETHAMINETMおよび／またはLEUCOVORINTMとの任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見細菌感染を予防的に処置または予防するために、LEUCOVORINTMおよび／またはNEUPOGENTMとの任意の組み合わせで使用される。

【0812】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、抗生物質薬剤と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る抗生物質としては、アモキシシリン、β-ラクタマーゼ、アミノ配糖体、β-ラクタム（糖ペプチド）、β-ラクタマーゼ、クリンダマイシン、クロラムフェニコール、セファロスポリン、シプロフロキサシン、シプロフロキサシン、エリスロマイシン、フルオロキノロン類、マクロライド系抗生物質、メトロニダゾル、ペニシリン、キノロン類、ラバマイシン、リファンピン、ストレプトマイシン、スルホンアミド、テトラサイクリン、トリメトプリム、トリメトプリム-スルファメトキサゾール、およびバンコマイシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0813】

他の実施形態において、本発明の治療剤は、免疫刺激物質と組み合わせて投与される。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得る免疫刺激物質としては、レバミゾール（例えば、ERGAMISILTM）、イソプリノシン（例えば、INOSIPLEXTM）、インターフェロン（例えば、インターフェロンα）、およびインターロイキン（例えば、IL-2）が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 8 1 4 】

他の実施形態では、本発明の治療剤は、免疫抑制剤と組み合わせて投与される。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得る免疫抑制剤としては、ステロイド類、シクロスポリン、シクロスポリンアナログ、シクロホスファミドメチルプレドニゾン、プレドニゾン、アザチオプリン、FK-506、15-デオキシスベルグアリン (15-deoxyspergualin)、および応答T細胞の機能を抑制することによって作用する他の免疫抑制剤が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得る他の免疫抑制剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：プレドニゾロン、メトトレキサート、サリドマイド、メトキサレン、ラパマイシン、レフルノミド、ミゾリビン (BREDININTM)、ブレキナル、デオキシスベルグアリン (deoxyspergualin)、およびアザスピラン (azaspirane) (SKF 105685)、ORTHOCLONE OKT (登録商標) 3 (マウスモノクローナル抗CD3抗体)、SANDIMMUNETM、NEORALTM、SANGDYATM (シクロスポリン)、PROGRAF (登録商標) (FK 506, タクロリムス)、CELLCEPT (登録商標) (マイコフェノラートモフェチル (mycophenolate mofetil)、その活性な代謝産物は、ミコフェノール酸である)、IMURANTM (アザチオプリン)、グルココルチコステロイド、副腎皮質ステロイド (例えば、DELTASONETM (プレドニゾロン) およびHYDELTRASOLTM (プレドニゾロン)、FOLEXTM およびMEXATETM (メトトレキサート)、OXSORAL EN-ULTRATM (メトキサレン) ならびにRAPAMUNETM (シロリムス (sirolimus))。特定の実施形態では、免疫抑制剤は、器官または骨髄移植の拒絶を予防するために使用され得る。

【 0 8 1 5 】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、単独でかまたは1以上の静脈内免疫グロブリン調製物と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る静脈内免疫グロブリン調製物としては、GAMMARTM、IVEE GAMTM、SANDOGLOBULINTM、GAMMAGARD S/DTM

TM、ATGAMTM（抗胸腺細胞グロブリン）およびGAMIMUNETMが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本発明の治療剤は、移植治療（例えば、骨髄移植）において静脈内免疫グロブリン調製物と組み合わせて投与される。

【 0 8 1 6 】

特定の実施形態では、本発明の治療剤は、単独または抗炎症性薬剤と組み合わせて投与される。本発明の治療剤と共に投与され得る抗炎症性薬剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：コルチコステロイド（例えば、ベタメタゾン、ブデソニド、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、およびトリアムシノロン）、非ステロイド性抗炎症薬物（例えば、ジクロフェナク、ジフルニサル、エトドラク、フェノプロフェン、フロクタフェニン、フルルビプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、メクロフェナム酸塩、メフェナム酸、メロキシカム、ナブメトン、ナプロキセン、オキサプロジン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、スリンダク、テノキシカム、チアプロフェン酸、およびトルメチン）、ならびに抗ヒスタミン薬、アミノアリールカルボン酸誘導体、アリール酢酸誘導体、アリール酪酸誘導体、アリールカルボン酸、アリールプロピオン酸誘導体、ピラゾール類、ピラゾロン類、サリチル酸誘導体、チアジンカルボキサミド類、 ϵ -アセトアミドカプロン酸、S-アデノシルメチオニン、3-アミノ-4-ヒドロキシ酪酸、アミキセトリン（amixetrine）、ベンダザック、ベンジダミン、プロローム、ジフェンピラミド、ジタゾール、エモルファゾン、グアイアズレン、ナブメトン、ニメスリド、オルゴテイン、オキサセプロール、パラニリン（paranyline）、ペリソキサール、ピフオキシム、プロカゾン、プロキサゾール、およびテニダブ。

【 0 8 1 7 】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、単独でかまたは抗脈管形成薬剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物とともに投与され得る抗脈管形成薬剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アンジオスタチン（Entremed, Rockville, MD）、トロボニン-1（Bost

on Life Sciences, Boston, MA)、抗侵襲性因子、レチノイン酸およびその誘導体、バクリタキセル(タキソール)、スラミン、メタロプロテイナーゼ-1の組織インヒビター、メタロプロテイナーゼ-2の組織インヒビター、VEGI、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター-1、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター-2および種々の形態のより軽い「d群」遷移金属。

【0818】

より軽い「d群」遷移金属としては、例えばバナジウム、モリブデン、タングステン、チタン、ニオブおよびタンタル種が挙げられる。そのような遷移金属種は、遷移金属錯体を形成し得る。上記の遷移金属種の適切な錯体としては、オキソ遷移金属錯体が挙げられる。

【0819】

バナジウム錯体の代表的な例としては、バナデート錯体およびバナジル錯体のようなオキソバナジウム錯体が挙げられる。適切なバナデート錯体としては、例えばメタバナジン酸アンモニウム、メタバナジン酸ナトリウムおよびオルトバナジン酸ナトリウムのようなメタバナデート錯体およびオルトバナデート錯体が挙げられる。適切なバナジル錯体としては、例えばバナジルアセチルアセトネートおよび硫酸バナジル(硫酸バナジルー水和物および硫酸バナジル三水和物のような硫酸バナジル水和物を含む)が挙げられる。

【0820】

タングステン錯体およびモリブデン錯体の代表的な例としてはまた、オキソ錯体が挙げられる。適切なオキソタングステン錯体としては、タングステート錯体およびタングステンオキシド錯体が挙げられる。適切なタングステート錯体としては、タングステン酸アンモニウム、タングステン酸カルシウム、タングステン酸ナトリウム二水和物およびタングステン酸が挙げられる。適切なタングステンオキシドとしては、タングステン(IV)オキシドおよびタングステン(VI)オキシドが挙げられる。適切なオキソモリブデン錯体としては、モリブデート、モリブデンオキシドおよびモリブデニル錯体が挙げられる。適切なモリブデート錯体としては、モリブデン酸アンモニウムおよびその水和物、モリブデン酸ナト

リウムおよびその水和物、ならびにモリブデン酸カリウムおよびその水和物が挙げられる。適切なモリブデンオキシドとしては、モリブデン(VI)オキシド、モリブデン(VI)オキシドおよびモリブデン酸が挙げられる。適切なモリブデニル錯体としては、例えばモリブデニルアセチルアセトネートが挙げられる。他の適切なタングステン錯体およびモリブデン錯体としては、例えばグリセロール、酒石酸および糖由来のヒドロキシ誘導体が挙げられる。

[0 8 2 1]

広範な種々の他の抗脈管形成因子もまた、本発明の状況において利用され得る。代表的な例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：血小板因子4；硫酸プロタミン；硫酸化キチン誘導体（クイーンクラブ（queen crab）の殻から調製される）（Murataら、Cancer Res. 51：22～26、1991）；硫酸化多糖ペプチドグリカン複合体（SP-PG）（この化合物の機能は、ステロイド（例えば、エストロゲン）およびクエン酸タモキシフェンの存在によって、増強され得る）；スタウロスポリン；基質代謝の調節因子（例えば、プロリンアナログ、シスヒドロキシプロリン、d, L-3, 4-デヒドロプロリン、チアプロリン、 α , α -ジピリジル、アミノプロピオニトリルフマレートを含む）；4-プロピル-5-(4-ピリジニル)-2(3H)-オキサゾロン；メトトレキサート；ミトザントロン；ヘパリン；インターフェロン；2マクログロブリン-血清；ChIMP-3（Pavloffら、J. Bio. Chem. 267：17321～17326、1992）；キモスタチン（Tomkinsonら、Biochem J. 286：475～480、1992）；シクロデキストリンテトラデカサルフェート；エボネマイシン；カンプトテシン；フマギリン（Ingberら、Nature 348：555～557、1990）；チオリンゴ酸金ナトリウム（「GST」；MatsubaraおよびZiff、J. Clin. Invest. 79：1440～1446、1987）；アンチコラゲナーゼ-血清； α 2-抗プラスミン（Holmesら、J. Biol. Chem. 262(4)：1659～1664、1987）；ピサントレン（National Cancer Institute）；ロベンザリットニナトリウム（N-(2)-カルボキシフェニル-4-クロロアント

ロニル酸 (chloroanthronilic acid) ニナトリウム、すなわち「CCA」; Takeuchiら、Agents Actions 36 : 312 ~ 316、1992) ; およびメタロプロテインヒビター (例えば、BB94) 。

[0 8 2 2]

本発明の状況において同様に利用され得るさらなる抗脈管形成因子としては、サリドマイド (Celgene, Warren, NJ) ; 血管拡張性ステロイド ; AGM-1470 (H. BremおよびJ. Folkman J Pediatr. Surg. 28 : 445 - 51 (1993)) ; インテグリン $\alpha v \beta 3$ アンタゴニスト (C. Storgardら、J Clin. Invest. 103 : 47 - 54 (1999)) ; カルボキシアミノイミダゾール (carboxyaminolimidazole) ; カルボキシアミドトリアゾール (CAI) (National Cancer Institute, Bethesda, MD) ; Conbretastatin A-4 (CA4P) (OXIGENE, Boston, MA) ; Squalamine (Magainin Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA) ; TNP-470, (Tap Pharmaceuticals, Deerfield, IL) ; ZD-0101 AstraZeneca (London, UK) ; APRA (CT2584) ; Benefin, Byrostatin-1 (SC339555) ; CGP-41251 (PKC 412) ; CM101 ; Dextrazoxane (ICRF187) ; DMXAA ; エンドスタチン ; Flavopridiol ; Genestein ; GTE ; ImmTher ; Iressa (ZD1839) ; Octreotide (ソマトスタチン) ; Panretin ; Penacillamine ; Photopoint ; PI-88 ; Prinomastat (AG-3340) Purlytin ; Suradista (FCE26644) ; タモキシフェン (Nolvadex) ; Tazarotene ; テトラチオモリブデート ; Xeloda (Capecitabine) ; および5-フルオロウラシルが挙げられる。

[0 8 2 3]

本発明の組成物と組み合わせて投与され得る抗脈管形成薬剤は、種々の機構を通じて作用し得、これらの機構としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：細胞外マトリックスのタンパク質分解の阻害、内皮細胞－細胞外マトリックス接着分子の機能のブロック、増殖因子のような脈管形成誘導因子の機能と拮抗すること、および増殖している内皮細胞において発現されるインテグリンレセプターの阻害。細胞外マトリックスタンパク質分解を妨害し、そして本発明の組成物と組み合わせて投与され得る抗脈管形成インヒビターの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：AG-3340 (Agouron, La Jolla, CA)、BAY-12-9566 (Bayer, West Haven, CT)、BMS-275291 (Bristol Myers Squibb, Princeton, NJ)、CGS-27032A (Novartis, East Hanover, NJ)、Marimastat (British Biotech, Oxford, UK) および Metastat (Aeterna, St-Foy, Quebec)。内皮細胞－細胞外マトリックス接着分子の機能をブロックすることにより作用し、そして本発明の組成物と組み合わせて投与され得る抗脈管形成インヒビターの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：EMD-121974 (Merck KgaA Darmstadt, Germany) および Vitaxin (Ixsys, La Jolla, CA/Medimmune, Gaithersburg, MD)。脈管形成誘導因子と直接拮抗するかまたはこの誘導因子を阻害することにより作用し、そして本発明の組成物と組み合わせて投与され得る抗脈管形成薬剤の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Angiozyme (Ribozyme, Boulder, CO)、抗VEGF抗体 (Genentech, S. San Francisco, CA)、PTK-787/ZK-225846 (Novartis, Basel, Switzerland)、SU-101 (Sugen, S. San Francisco, CA)、SU-5416 (Sugen/Pharmacia Upjohn, Bridgewater, NJ)、およびSU-6668 (Sugen)。他の抗脈管形成薬剤は、脈管形成を間接的に阻害するように作用する。本発明の組成物と組み合わせて投与され

得る脈管形成の間接的インヒビターの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：IM-862 (Cyttran, Kirkland, WA)、インターフェロン- α 、IL-12 (Roche, Nutley, NJ)、およびベントサンボリスルフェート (Georgetown University, Washington, DC)。

【0824】

特定の実施形態において、抗脈管形成薬剤と組み合わせた本発明の組成物の使用は、自己免疫疾患（例えば、本明細書中に記載の自己免疫疾患）の処置、予防、および／または回復のために企図される。

【0825】

特定の実施形態において、抗脈管形成薬剤と組み合わせた本発明の組成物の使用は、関節炎の処置、予防、および／または回復のために企図される。さらに特定の実施形態において、抗脈管形成薬剤と組み合わせた本発明の組成物の使用は、慢性関節リウマチの処置、予防、および／または回復のために企図される。

【0826】

別の実施形態において、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、脈管形成タンパク質または脈管形成タンパク質をコードするポリヌクレオチドと一緒に投与され得る。本発明の組成物とともに投与され得る脈管形成タンパク質の例としては、酸性および塩基性の線維芽細胞増殖因子、VEGF-1、VEGF-2、VEGF-3、上皮増殖因子 α および β 、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、腫瘍壊死因子 α 、肝細胞増殖因子、インスリン様増殖因子、コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子、および一酸化窒素シンターゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【0827】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、化学療法剤と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る化学療法剤としては、アルキル化剤（例えば、ナイトロジェンマスタード（例えば、メクロレタミン、シクロホスファミド、シクロホスファミドイホスファミド (Cyclophospham

ide Ifosfamide)、メルファラン(L-サルコリジン)、およびクロラムブシル)、エチレンイミン、およびメチルメルアミン(例えば、ヘキサメチルメラミンおよびチオテバ)、硫酸アルキル(例えば、ブスルファン)、ニトロソ尿素類(例えば、カルムスチン(BCNU)、ロムスチン(CCNU)、セムスチン(メチルCCNU)、およびストレプトソシン(ストレプトゾトシン))、トリアゼン(triazene)(例えば、ダカルバジン、(DTIC; ジメチルトリアゼノイミダゾールカルボキシアミド(dimethyl triazenoimidazolecarboxamide))、葉酸アナログ(例えば、メトトレキセート(アメトプテリン))、ピリミジンアナログ(例えば、フルオロウラシル(5-フルオロウラシル; 5-FU)、フロクスリジン(フルオロデオキシウリジン; FudR)、およびシタラビン(シトシンアラビノシド))、プリンアナログおよびプリン関連阻害剤(例えば、メルカプトプリン(6-メルカプトプリン; 6-MP)、チオグアニン(6-チオグアニン; TG)、およびベントスタチン(2'-デオキシコフォルマイシン)、ビンカアルカロイド(例えば、ビンブラスチン(VLB、硫酸ビンブラスチン))およびピンクリスチン(硫酸ピンクリスチン))、エピポドフィロトキシシン(epipodophyllotoxin)(例えば、エトポシドおよびテニポシド)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(アクチノマイシンD)、ダウノルピシン(ダウノマイシン; ルビドマイシン)、ドキシルピシン、ブレオマイシン、プリカマイシン(Plicamycin)(ミトラマイシン)、およびマイトマシ(マイトマイシンC)、酵素(例えば、L-アスパラギナーゼ)、生物学的応答変更因子(例えば、インターフェロン α およびインターフェロン $\alpha-2b$)、白金錯体組成物(例えば、シスプラチン(cis-DDP)およびカルボプラチン)、アントラシンジオン(anthracenedione)(ミトキサントロン)、置換尿素(例えば、ヒドロキシ尿素)、メチルヒドラジン誘導体(例えば、プロカルバジン(N-メチルヒドラジン; MIH)、アドレノコルチコステロイド(例えば、プレドニゾロン)、プロゲスチン(例えば、ヒドロキシプロゲステロンカプロエート(Hydroxyprogesterone caproate)、メドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、および酢酸メゲスト

ロール)、エストロゲン(例えば、ジエチルスチルベストロール(DES)、ジエチルスチルベストロールジホスフェート、エストラジオール、およびエチニルエストラジオール)、抗エストロゲン(例えば、タモキシフェン)、アンドロゲン(プロピオン酸テストステロン、およびフルオキシメステロン)、抗アンドロゲン(例えば、フルタミド)、ゴナドトロピン放出ホルモンアナログ(例えば、ロイプロリド)、他のホルモンおよびホルモンアナログ(例えば、メチルテストステロン、エストラムスチン、エストラムスチンリン酸ナトリウム、クロロトリアニセン、およびテストラクトン)、および他のもの(例えば、ジカルバジン(dicarbazine)、グルタミン酸、およびミトタン)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0828】

1つの実施形態において、本発明の組成物は、1つ以上の以下の薬物と組み合わせて投与される: インフリキシマブ(infliximab)(これはまた、RemicadeTM Centocor, Inc. として公知である)、トロケイド(Trocade)(Roche, RO-32-3555)、レフルノミド(Leflunomide)(これはまた、Hoechst Marion Roussel 製のAravaTM として公知である)、KineretTM (これは、Amgen, Inc 製のアナキンラ(Anakinra)として、また公知である、IL-1レセプターアンタゴニスト)。

【0829】

特定の実施形態において、本発明の組成物は、CHOP(シクロホスファミド、ドキソルピシン、ビンクリスチン、およびプレドニゾン)と組み合わせて投与されるか、またはCHOPの成分の1以上の組み合わせで投与される。ある実施形態において、本発明の組成物は、抗CD20抗体(ヒトモノクローナル抗CD20抗体)と組み合わせて投与される。別の実施形態において、本発明の組成物は、抗CD20抗体およびCHOPと共に、または抗CD20抗体およびCHOPの1以上の成分(特に、シクロホスファミドおよび/またはプレドニゾン)の任意の組み合わせと共に投与される。特定の実施形態において、本発明の組成物は、リツキシマブ(Rituximab)と組み合わせて投与される。さらなる

実施形態において、本発明の組成物は、リツキシマブおよびCHOPと共に、またはリツキシマブおよびCHOPの1以上の成分（特に、シクロホスファミドおよび／またはプレドニゾン）の任意の組み合わせと共に投与される。特定の実施形態において、本発明の組成物は、トシツモマブ（*tositumomab*）と組み合わせて投与される。さらなる実施形態において、本発明の組成物は、トシツモマブおよびCHOPと共に、またはトシツモマブおよびCHOPの1以上の成分（特に、シクロホスファミドおよび／またはプレドニゾン）の任意の組み合わせと共に投与される。抗CD20抗体を、放射性同位元素、毒素、または細胞毒性プロドラッグと任意に結合され得る。

【0830】

別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、*Zevalin*TMと組み合わせて投与される。さらなる実施形態において、本発明の組成物は、*Zevalin*TMおよびCHOPと共に、または*Zevalin*TMおよびCHOPの1以上の成分（特に、シクロホスファミドおよび／またはプレドニゾン）の任意の組み合わせと共に投与される。*Zevalin*TMを、1以上の放射性同位元素と結合させ得る。特に好ましい同位元素は、⁹⁰Yおよび¹¹¹Inである。

【0831】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、サイトカインと組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得るサイトカインとしては、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL10、IL12、IL13、IL15、抗CD40、CD40L、IFN- γ およびTNF- α が挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態において、本発明の治療剤は、任意のインターロイキン（IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20およびIL-21を含むが、これらに限定されない）と共に投与され得る。

【0832】

1つの実施形態において、本発明の治療剤は、TNFファミリーのメンバーと

組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得るTNF分子、TNF関連分子、またはTNF様分子としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：可溶性形態のTNF- α 、リンホトキシン- α (LT- α 、TNF- β としても公知)、LT- β (複合ヘテロトリマーLT- α 2- β 中に見出される)、OPGL、FasL、CD27L、CD30L、CD40L、4-1BBL、DcR3、OX40L、TNF- γ (国際公開番号WO96/14328)、AIM-I (国際公開番号WO97/33899)、エンドカイン- α (国際公開番号WO98/07880)、OPG、およびニュートロカイン- α (国際公開番号WO98/18921)、OX40、および神経成長因子 (NGF)、ならびに可溶性形態のFas、CD30、CD27、CD40および4-1BBL、TR2 (国際公開番号WO96/34095)、DR3 (国際公開番号WO97/33904)、DR4 (国際公開番号WO98/32856)、TR5 (国際公開番号WO98/30693)、TRANK、TR9 (国際公開番号WO98/56892)、TR10 (国際公開番号WO98/54202)、312C2 (国際公開番号WO98/06842)、およびTR12、ならびに可溶性形態のCD154、CD70、およびCD153。

【0833】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、脈管形成タンパク質と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る脈管形成タンパク質としては、欧州特許番号EP-399816に開示されるようなグリオーマ由来増殖因子 (GDGF)；欧州特許番号EP-682110に開示されるような血小板由来増殖因子A (PDGF-A)；欧州特許番号EP-282317に開示されるような血小板由来増殖因子B (PDGF-B)；国際公開番号WO92/06194号に開示されるような胎盤増殖因子 (PlGF)；Hauserら、Growth Factors、4:259-268 (1993)に開示されるような胎盤増殖因子2 (PlGF-2)；国際公開番号WO90/13649号に開示されるような血管内皮増殖因子 (VEGF)；欧州特許番号EP-506477に開示されるような血管内皮増殖因子A (VEGF-A)；国際公開番号WO96/39515号に開示されるような血管内皮増殖因子2 (VEGF-2)

；血管内皮増殖因子B（VEGF-3）；国際公開番号WO96/26736号に開示されるような血管内皮増殖因子B-186（VEGF-B186）；国際公開番号WO98/02543号に開示されるような血管内皮増殖因子D（VEGF-D）；国際公開番号WO98/07832号に開示されるような血管内皮増殖因子D（VEGF-D）；およびドイツ国特許番号DE19639601に開示されるような血管内皮増殖因子E（VEGF-E）が挙げられるが、これらに限定されない。上記の参考文献は、その全体が本明細書で参考として援用される。

【0834】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、線維芽細胞増殖因子と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る線維芽細胞増殖因子としては、FGF-1、FGF-2、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-9、FGF-10、FGF-11、FGF-12、FGF-13、FGF-14、およびFGF-15が挙げられるが、これらに限定されない。

【0835】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、造血系成長因子と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る造血系成長因子としては、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）（サルグラモスチム（sargramostim）、LEUKINETM、PROKINETM）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）（フィルグラスチム、NEUPOGENTM）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF、CSF-1）、エリスロポエチン（エポエチン α 、EPOGENTM、PROCRITTM）、幹細胞因子（SCF、c-kitリガンド、鉄剤（steel factor））、巨核球コロニー刺激因子、PIXY321（GMCSF/IL-3融合タンパク質）、インターロイキン、特にIL-1からIL-12までのいずれか1つ以上、インターフェロン γ またはトロンボポエチンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0836】

特定の実施形態において、本発明の治療剤は、アドレナリン遮断薬（例えば、アセブトロール、アテノロール、ベタキソロール、ビソプロロール（b i s o p r o l o l）、カルテロール（c a r t e o l o l）、ラベタロール、メトプロロール、ナドロール、オクスプレノロール、ペンブトロール（p e n b u t o l o l）、ピンドロール、プロプラノロール、ソタロール、およびチモロール）と組み合わせて投与される。

【 0 8 3 7 】

別の実施形態において、本発明の治療剤は、抗不整脈薬（例えば、アデノシン、アミドアロン、ブレチリウム、ジキタリス、ジゴキシン、ジギトキシン、ジリアゼム（d i l i a z e m）、ジソピラミド、エスモロール、フレカイニド、リドカイン、メキシレチン、モリシジン（m o r i c i z i n e）、フェニトイン、ナロカインアミド、N-アセチルプロカインアミド、プロパフェノン、プロプラノロール、キニジン、ソタロール、トカイニド、およびベラパミル）と組み合わせて投与される。

【 0 8 3 8 】

別の実施形態において、本発明の治療剤は、利尿薬（例えば、炭酸脱水酵素阻害薬（例えば、アセタゾラミド、ジクロルフェナミド、およびメタゾルアミド）、浸透圧性利尿薬（例えば、グリセリン、イソソルビド、マンニトール、および尿素）、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ 共輸送阻害利尿薬（例えば、フロセミド、ブメタニド、アゾセミド（a z o s e m i d e）、ピレタニド、トリパミド、エタクリン酸、ムゾリミン（m u z o l i m i n e）、およびトルセミド（t o r s e m i d e））、チアジドおよびチアジド様利尿薬（例えば、ベンドロフルメサイアザイド、ベンズサイアザイド、クロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメチアジド、メチルクロチアジド、ポリチアジド、トリクロメチアジド（t r i c h o r m e t h i a z i d e）、クロルタリドン、インダパミド、メトラゾン、およびキネサゾン）、カリウム節約利尿薬（例えば、アミロライドおよびトリウムテレン）、および鉱質コルチコイドレセプターアンタゴニスト（例えば、スピロノラクトン、カンレノン（c a n r e n o n e）、およびカンレノエートカリウム（p o t a s s i u m c a n r e n o a t e））と組み合わせて

投与される。

【 0 8 3 9 】

1つの実施形態において、本発明の治療剤は、内分泌物および／またはホルモンの不均衡障害のための処置剤と組み合わせて投与される。内分泌物および／またはホルモンの不均衡障害のための処置剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない： ^{127}I 、ヨウ素の放射性同位元素（例えば、 ^{131}I および ^{123}I ）；組換え成長ホルモン（例えば、HUMATROPETM（組換えソマトロピン））；成長因子アナログ（例えば、PROTROPINTM（ソマトレム））；ドーパミンアゴニスト（例えば、PARLODELTM（プロモクリプチン））；ソマトスタチンアナログ（例えば、SANDOSTATINTM（オクトレオチド））；ゴナドトロピン調製物（例えば、PREGNYLTM、A. P. L.TM およびPROFASITTM（絨毛性ゴナドトロピン（CG）））、PERGONALTM（メノトロピン）、およびMETRODINTM（尿性卵胞性刺激ホルモン（uFSH））；合成ヒトゴナドトロピン放出ホルモン調製物（例えば、FACTRELTM およびLUTREPULSETM（塩酸ゴナドレリン））；合成ゴナドトロピンアゴニスト（例えば、LUPRONTM（酢酸ロイプロリド）、SUPPRELINTM（酢酸ヒストレリン（histrelin acetate））、SYNARELTM（酢酸ナファレリン（nafarelin acetate））、およびZOLADEXTM（酢酸ゴセレリン（goserelin acetate）））；甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン合成調製物（例えば、RELEFACT TRHTM およびTHYPINONETM（プロチレリン））；組換えヒトTSH（例えば、THYROGENTM）；甲状腺ホルモンの天然異性体のナトリウム塩の合成調製物（例えば、L-T₄TM、SYNTHROIDTM およびLEVOTHROIDTM（レボチロキシナトリウム（levothyroxine sodium））、L-T₃TM、CYTOMELTM およびTRIOSTATTM（リオチロインナトリウム（liothyroine sodium））、およびTHYROLARTM（リオトリックス））；抗甲状腺組成物（例えば、6-n-プロピルチオウラシル（プロピルチオウラシル）、1-メチル-2-メルカプトイミダゾールおよび

TAPAZOLETM (メチマゾール)、NEO-MERCAZOLETM (カルピマゾール) ; β アドレナリン作用性レセプターアンタゴニスト (例えば、プロプラノロールおよびエスモロール) ; Ca^{2+} チャネル阻害剤 ; デキサメタゾンおよびヨウ素の放射線医学的造影剤 (例えば、TELEPAQUETM (ヨーバン酸) およびORAGRAFINTM (イボダートナトリウム)) 。

【 0 8 4 0 】

内分泌物および／またはホルモンの不均衡障害のためのさらなる処置剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない : エストロゲンまたは結合体化エストロゲン (例えば、ESTRACETM (エストラジオール)、ESTINYLTM (エチニルエストラジオール)、PREMARINTM、ESTRATABTM、ORTHO-ESTTM、OGENTM およびエストロピベイト (estropipate) (エストロン)、ESTROVISTM (キネストロール)、ESTRADERMTM (エストラジオール)、DELESTROGENTM およびVALERGENTM (吉草酸エストラジオール)、DEPO-ESTRADIOL CYPIONATETM およびESTROJECT LATM (エストラジオールシビオネート)) ; 抗エストロゲン (例えば、NOLVADEXTM (タモキシフェン)、SEROPHENETM およびCLOMIDTM (クロミフェン)) ; プロゲスチン (例えば、DURALUTINTM (カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン) (hydroxyprogesterone caproate))、MPATM およびDEPO-PROVERATM (酢酸メドロキシプロゲステロン)、PROVERATM およびCYCRINTM (MPA)、MEGACETM (酢酸メゲストロール)、NORLUTINTM (ノルエチンドロン))、ならびにNORLUTATETM およびAYGESTINTM (酢酸ノルエチンドロン)) ; プロゲステロンインプラント (例えば、NORPLANT SYSTEMTM (ノルゲストレルの皮下移植) ; 抗黄体ホルモン (例えば、RU 486TM (ミフェプリストン)) ; ホルモン避妊薬 (例えば、ENOVIDTM (ノルエチノドレル+メストラノール)、PROGESTASERTTM (プロゲステロンを放出する子宮内器具)、LOESTRINTM、BREVICONTM、MODICONTM、GENORATM、NELON

A^{T M}、NORINYL^{T M}、OVACON-35^{T M} およびOVACON-50^{T M} (エチニルエストラジオール／ノルエチンドロン)、LEVLEN^{T M}、NORDETTE^{T M}、TRI-LEVLEN^{T M} およびTRIPHASIL-21^{T M} (エチニルエストラジオール／レボノルゲストレル (levonorgestrel)) LO/OVRAL^{T M} およびOVRAL^{T M} (エチニルエストラジオール／ノルゲストレル)、DEMULEN^{T M} (エチニルエストラジオール／二酢酸エチノジオール)、NORINYL^{T M}、ORTHO-NOVUM^{T M}、NORETHIN^{T M}、GENORA^{T M}、およびNELOVA^{T M} (ノルエチンドロン／メストラノール)、DESOGEN^{T M} およびORTHO-CEPT^{T M} (エチニルエストラジオール／デソゲステレル (desogestrel))、ORTHO-CYCLEN^{T M} およびORTHO-TRICYCLEN^{T M} (エチニルエストラジオール／ノルゲスチメート (norgestimate))、MICRONOR^{T M} およびNOR-QD^{T M} (ノルエチンドロン)、およびOVRETTE^{T M} (ノルゲストレル)。

【 0 8 4 1 】

内分泌物および／またはホルモンの不均衡障害のためのさらなる処置剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：テストステロンエステル（例えば、酢酸メテノロン (methenolone acetate) およびテストステロンアンデカノエート (undecanoate)；非経口および経口アンドロゲン（例えば、TESTOJECT-50^{T M} (テストステロン)、TESTEX^{T M} (プロピオン酸テストステロン)、DELATESTRYL^{T M} (エナンタートテストステロン)、DEPO-TESTOSTERONE^{T M} (シビオネートテストステロン)、DANOCRINE^{T M} (ダナゾール)、HALOTESTIN^{T M} (フルオキシメステロン)、ORETON METHYL^{T M}、TESTRED^{T M} およびVIRILON^{T M} (メチルテストステロン)、およびOXANDRIN^{T M} (オキサンドロロン)；テストステロン経皮的システム（例えば、TESTODERM^{T M}）；アンドロゲンレセプターアンタゴニストおよび5- α -レダクターゼ阻害剤（例えば、ANDROCUR^{T M} (酢酸シプロテロン)、EULEXIN^{T M} (フルタミド)、およびPROSCAR^T

™ (フィナステリド (finasteride)) ; 副腎皮質刺激ホルモン調製物 (例えば、CORTROSYN™ (コシントロピン)) ; 副腎皮質ステロイドおよびこれらの合成アナログ (例えば、ACLOVATE™ (ジプロピオン酸アルクロメタゾン)、CYCLOCORT™ (アムシノニド)、BECLOVENT™ およびVANCERIL™ (ジプロピオン酸ベクロメタゾン)、CELESTONE™ (ベタメタゾン)、BENISONE™ およびUTICORT™ (安息香酸ベタメタゾン)、DIPROSONE™ (ジプロピオン酸ベタメタゾン)、CELESTONE PHOSPHATE™ (ベタメタゾンリン酸ナトリウム塩)、CELESTONE SOLUSPAN™ (ベタメタゾンリン酸ナトリウムおよび酢酸ベタメタゾン)、BETA-VAL™ およびVALISONE™ (吉草酸塩ベタメタゾン)、TEMOVATE™ (プロピオン酸クロベタゾール)、CLODERM™ (クロコルトロンビバレート)、CORTEF™ およびHYDROCORTONE™ (コルチソル (ヒドロコルチゾン))、HYDROCORTONE ACETATE™ (酢酸コルチソル (ヒドロコルチゾン))、LOCOID™ (酪酸コルチソル (ヒドロコルチゾン))、HYDROCORTONE PHOSPHATE™ (コルチソル (ヒドロコルチゾン) リン酸ナトリウム塩)、A-HYDROCORT™ およびSOLU CORTEF™ (コルチソル (ヒドロコルチゾン) コハク酸ナトリウム塩)、WESTCORT™ (吉草酸コルチソル (ヒドロコルチゾン))、CORTISONE ACETATE™ (酢酸コルチゾン)、DESOWEN™ およびTRIDESILON™ (デソニド)、TOPICORT™ (デスオキシメタゾン)、DECADRON™ (デキサメタゾン)、DECADRON LA™ (酢酸デキサメタゾン)、DECADRON PHOSPHATE™ およびHEXADROL PHOSPHATE™ (デキサメタゾンリン酸ナトリウム塩)、FLORONE™ およびMAXIFLOR™ (酢酸ジフロラゾン)、FLORINEF ACETATE™ (酢酸フルドロコルチゾン)、AEROBID™ およびNASALIDE™ (フルニソリド)、FLUONID™ およびSYNALAR™ (フルオシノロンアセトニド)、LIDEX™ (フルオシノニド)、FLUOR-OP™ およびFML™

(フルオロメトロン)、CORDRANTM (フルランドレノリド)、HALOGTM (ハルシノニド)、HMS LIZUIFILMTM (メドリゾン)、MEDROLTM (メチルプレドニゾン)、DEPO-MEDROLTM および MEDROL ACETATETM (酢酸メチルプレドニゾン)、A-METHAPREDTM およびSOLUMEDROLTM (メチルプレドニゾンコハク酸ナトリウム塩)、ELOCONTM (モメタゾン (mometasone) フロエート)、HALDRONETM (酢酸パラメタゾン)、DELTA-CORTEFTM (プレドニゾン)、ECONOPREDTM (酢酸プレドニゾン)、HYDELTRASOLTM (プレドニゾンリン酸ナトリウム塩)、HYDELTRA-T.B.ATM (プレドニゾンテブテート)、DELTASONETM (プレドニゾン)、ARISTOCORTTM およびKENACORTTM (トリアムシノロン)、KENALOGTM (トリアムシノロンアセトニド)、ARISTOCORTTM およびKENACORT DIACETATETM (トリアムシノロンジアセテート)、およびARISTOSPANTM (ヘキサアセトニド (hexacetoneide) トリアムシノロン) ; 副腎皮質ステロイドの生合成阻害剤および作用阻害剤 (例えば、CYTADRENTM (アミノグルテチミド)、NIZORALTM (ケトコナゾール)、MODRASTANETM (トリロスタン)、およびMETOPIRONETM (メチラポン)) 。

【 0 8 4 2 】

内分泌物および／またはホルモンの不均衡障害のためのさらなる処置剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ウシ、ブタもしくはヒトインスリンまたはそれらの混合物；インスリンアナログ；組換えヒトインスリン（例えば、HUMULINTM およびNOVOLINTM）；経口低血糖症薬物（例えば、ORAMIDETM およびORINASETM (トルブタミド)、DIABINESETM (クロルプロバミド)、TOLAMIDETM およびTOLINASETM (トラザミド)、DYMELORTM (アセトヘキサミド)、グリベンクラミド (glibenclamide)、MICRONASETM、DIBETATM およびGLYNASETM (グリブリド)、GLUCOTROLTM) 。

(グリビジド)、およびDIAMICRONTM (グリクラジド)、GLUCOPHAGETM (メトホルミン)、PRECLOSETM (アカルボース)、AMARYLTM (グリメピライド) およびシグリタゾン (thiazolidinedione) (TZD) (例えば、ロシグリタゾン (rosiglitazone)、AVANDIATM (マレイン酸ロシグリタゾン)、ACTOSTM (ピオグリタゾン、およびトログリタゾン (troglitazone) ; α -グルコシダーゼ阻害剤 ; ウシもしくはブタのグルカゴン ; ソマトスタチン (例えば、SANDOSTATINTM (オクトレオチド) ; およびジアソキシド (例えば、PROGLYCEMTM (ジアソキシド))。また他の実施形態において、本発明の治療剤は、1つ以上の以下 : ビグアナイド抗糖尿病薬剤、グリタゾン抗糖尿病薬剤、およびスルホニル尿素抗糖尿病薬剤と組み合わせて投与される。

【0843】

1つの実施形態において、本発明の治療剤は、子宮運動性障害のための処置剤と組み合わせて投与される。子宮運動性障害のための処置剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない : エストロゲン薬物 (例えば、結合体化エストロゲン (例えば、PREMARIN (登録商標) およびESTRATAB (登録商標))、エストラジオール (例えば、CLIMARA (登録商標) およびALORA (登録商標))、エストロピペイト (estropipate)、およびクロロトリアニセン ; プロゲステロン薬物 (例えば、AMEN (登録商標) (メドロキシプロゲステロン)、MICRONOR (登録商標) (酢酸ノルエチンドロン (norethidrone))、PROMETRIUM (登録商標) プロゲステロン、および酢酸メゲストロール) ; およびエストロゲン/プロゲステロン併用治療 (例えば、結合体化エストロゲン/メドロキシプロゲステロン (例えば、PREMPROTM およびPREMPHASE (登録商標)) および酢酸ノルエチンドロン/エチニルエストラジオール (例えば、FEMHRTTM))。

【0844】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、鉄欠乏性貧血および低色性貧

血のための処置に有用な薬物とともに投与され、これらの薬物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：硫酸第一鉄（硫酸鉄、F E O S O L^{T M}）、フマル酸第一鉄（例えば、F E O S T A T^{T M}）、グルコン酸第一鉄（例えば、F E R G O N^{T M}）、多糖類-鉄複合体（例えば、N I F E R E X^{T M}）、鉄デキストラン注入（例えば、I N F E D^{T M}）、硫酸銅、ピロキシジン（p y r o x i d i n e）、リボフラビン、ビタミンB₁₂、シアノコバラミン注入（例えば、R E D I S O L^{T M}、R U B R A M I N P C^{T M}）、ヒドロキソコバラミン、葉酸（例えば、F O L V I T E^{T M}）、ロイコボリン（フォルリン酸、5-CH₂OH₄P t e G l u、シトロボラム因子）またはW E L L C O V O R I N（ロイコボリンのカルシウム塩）、トランスフェリンまたはフェリチン。

【 0 8 4 5 】

特定の実施形態において、本発明の治療剤は、精神障害のための薬剤と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る精神障害の薬剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗精神病薬（例えば、クロロプロマジン、クロロプロチキセン、クロザピン、フルフェナジン、ハロペリドール、ロクサピン、メソリダジン、モリンドン、オランザピン（o l a n z a p i n e）、パーフェナジン、ピモジド、クエチアピン（q u e t i a p i n e）、リスベリドン、チオリダジン、チオチキセン、トリフルオベラジン、およびトリフルプロマジン）、抗躁病薬（例えば、カルバマゼピン、ジバルブロックスナトリウム、炭酸リチウム、およびクエン酸リチウム）、抗うつ薬（例えば、アミトリプチリン、アモキサピン、ビュープロピオン、シタロプラム、クロミプラミン、デシプラミン、ドキセピン、フルボキサミン、フルオキセチン、イミプラミン、イソカルボキサジド、マプロチリン、ミルタザピン、ネフォゾドン、ノルトリプチリン、パロキセチン、フェネルジン、プロトリプチリン、セルトラリン、トラニルシプロミン、トラゾドン、トリミプラミン、およびベンラファキシン）、抗不安薬（例えば、アルプラゾラム、ブスピロン、クロルジアゼポキシド、クロラゼパート、ジアゼパム、ハラゼパム、ロラゼパム、オキサゼパム、およびブラゼパム）、ならびに興奮薬（例えば、d-アンフェタミン、メチルフェニデート、およびベモリン）。

【 0 8 4 6 】

他の実施形態において、本発明の治療剤は、神経学的傷害を処置するために使用される薬剤と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る神経学的薬剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：鎮痙薬（例えば、カルバマゼピン、クロナゼパム、エトスクシミド、フェノバルビタール、フェニトイン、プリミドン、バルプロ酸、ジバルブロックスナトリウム、フェルバメート、ガバペンチン、ラモトリジン、レベチラセタム、オクスカルバゼピン、チアガビン（*tiagabine*）、トピラマート、ゾニサミド、ジアゼパム、ロラゼパム、およびクロナゼパム）、抗パーキンソン症候群薬（例えば、レボドパ/カルbidopa、セレジリン、アマンチジン（*amantidine*）、プロモクリプチン、ベルゴリド、ロビニロール、プラミベキソール、ベンズトロピン；ピベリデン；エトプロバジン；プロシクリジン；トリヘキシフェニジル、トルカポン（*tolcapone*））、およびALS治療剤（例えば、リルゾール（*riluzole*））。

【 0 8 4 7 】

別の実施形態において、本発明の治療剤は、血管弛緩薬および/またはカルシウムチャンネル阻害剤と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る血管弛緩薬としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アンギオテンシン変換酵素（ACE）インヒビター（例えば、ババベリン、イソクスブリン、ペナゼプリル、カプトプリル、シラザプリル、エナラプリル、エナラプリラート、ホシノプリル、リジノプリル、モエキシプリル、ペリインドプリル、キナプリル、ラミプリル、スピラプリル、トランドラプリル、およびナイリドリ）、ならびに硝酸塩（例えば、イソソルビドジニトレート、イソソルビドモノニトレート、およびニトログリセリン）。本発明の治療剤とともに投与され得るカルシウムチャンネル阻害剤の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アムロジピン、ベプリジル、ジルチアゼム、フェロジピン、フルナリジン、イスラジピン、ニカルジピン、ニフェジピン、ニモジピン、およびベラパミル。

【 0 8 4 8 】

特定の実施形態において、本発明の治療剤は、胃腸の障害ための処置と組み合わせて投与される。本発明の治療薬と共に投与され得る胃腸の障害のために処置としては以下が挙げられるがこれらに限定されない： H_2 ヒスタミンレセプターアンタゴニスト（例えば、TAGAMETTM（シメチジン）、ZANTACTM（ラニチジン）、PEPCIDTM（ファモチジン）、およびAXIDTM（ニザチジン））； H^+ 、 K^+ ATPaseのインヒビター（例えば、PREVACIDTM（ランソプラゾール）およびPRILOSECTM（オメプラゾール））；ビスマス化合物（例えば、PEPTO-BISMOLTM（次サリチル酸ビスマス）およびDE-NOLTM（次硝酸ビスマス））；種々の制酸薬；スクラルファート；プロスタグランジンアナログ（例えば、CYTOTECTM（ミソプロストール））；ムスカリン様コリン作用アンタゴニスト；緩下薬（例えば、界面活性剤緩下薬、刺激性緩下薬、塩性緩下薬（saline laxative）および浸透圧性緩下薬）；下痢止め薬剤（例えば、LOMOTILTM（ジフェノキシラート）、MOTOFENTM（ジフェノキシシン）、およびIMODIUMTM（塩酸ロペラミド））、SANDOSTATINTM（オクトレオチド）のようなソマトスタチンの合成アナログ、制吐薬（例えば、ZOFRANTM（オンダンセトロン）、KYTRILTM（塩酸グラニセトロン）、トロピセトロン、ドラセトロン（dolasetron）、メトクロプラミド、クロルプロマジン、パーフェナジン、プロクロルペラジン、プロメタジン、チエチルペラジン、トリフルプロマジン、ドンペリドン、ハロペリドール、ドロペリドール、トリメトベンズアミド、デキサメタゾン、メチルプレドニゾロン、ドロナピノールおよびナピロン）； D_2 アンタゴニスト（例えば、メトクロプラミド、トリメトベンズアミドおよびクロルプロマジン）；胆汁酸塩；ケノデオキシコール酸；ウルソデオキシコール酸；ならびにパンクレアチンおよびパンクレリパーゼのような膵臓酵素調製物。

【0849】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、他の治療法または予防療法（例えば、放射線療法）と組み合わせて投与される。

【0850】

(実施例11：ポリペプチドのレベル低下を処置する方法)

個体におけるポリペプチドの標準の発現レベルまたは正常発現レベルの低下により引き起こされる状態は、本発明のポリペプチドを好ましくは分泌形態および／または可溶性形態で投与することにより処置し得ることが理解される。従って、本発明はまた、このポリペプチドのレベルの増加が必要な個体の処置方法を提供する。この方法は、このような個体に、このような個体でこのポリペプチドの活性レベルを増加させる量のポリペプチドを含む治療的組成物を投与する工程を包含する。

【0851】

例えば、ポリペプチドのレベルが低下した患者は、そのポリペプチドを、日用量 $0.1 \sim 100 \mu\text{g} / \text{kg}$ で6日間続けて服用する。好ましくは、ポリペプチドは分泌形態である。投与および処方物に基づく投薬計画の正確な詳細は、実施例10に提供されている。

【0852】

(実施例12：ポリペプチドのレベル上昇を処置する方法)

アンチセンス技術を使用して本発明のポリペプチドの産生を阻害する。この技術は、ガンのような様々な病因に起因する、好ましくは分泌形態のポリペプチドのレベルを低下させる方法の1つの例である。

【0853】

例えば、ポリペプチドのレベルが異常に上昇したと診断された患者に、アンチセンスポリヌクレオチドを、 0.5 、 1.0 、 1.5 、 2.0 および $3.0 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ で21日間、静脈内投与する。この処置が十分に耐えられた場合は、7日間の休薬期間後に、この処置を繰り返す。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、本明細書に記載されている技術および処方物（例えば、実施例10を参照のこと）を用いて、さもなければ当該分野で公知の技術および処方物を用いて処方され得る。

【0854】

(実施例13：遺伝子治療を使用する処置方法－エキソピボ)

遺伝子治療の1つの方法は、ポリペプチドを発現し得る線維芽細胞を患者に移

植する。一般に、線維芽細胞は、皮膚生検により被験者から得られる。得られた組織を組織培養培地中に配置し、小片に分割する。組織の小塊を組織培養フラスコの湿潤表面に置き、約10片を各フラスコに置く。このフラスコを倒置し、しっかりと閉めた後、室温で一晩放置する。室温で24時間後、フラスコを反転させ、組織塊をフラスコの底に固定させたままにし、そして新鮮な培地（例えば、10% FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有するHamのF12培地）を添加する。次に、フラスコを37℃で約1週間インキュベートする。

【0855】

この時点で、新鮮な培地を添加し、次いで数日ごとに取り換える。さらに二週間培養した後に、単層の線維芽細胞が出現する。この単層をトリプシン処理し、さらに大きなフラスコにスケールアップする。

【0856】

モロニーマウス肉腫ウイルスの長末端反復が隣接するpMV-7 (Kirschmeier, P. T. ら、DNA, 7:219-25 (1988)) をEcoRIおよびHindIIIで消化した後、仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。線状ベクターをアガロースゲル上で分画し、そしてガラスビーズを使用して精製する。

【0857】

本発明のポリペプチドをコードするcDNAを、プライマーを用い、そして必要な場合、適切な制限部位および開始／終止コドンを含む、実施例1に記載のそれぞれ5'末端配列および3'末端配列に対応するPCRプライマーを使用して増幅し得る。好ましくは、この5'プライマーはEcoRI部位を含み、そしてこの3'プライマーはHindIII部位を含む。等量の、モロニーマウス肉腫ウイルスの線状骨格および増幅したEcoRIおよびHindIIIフラグメントを、T4 DNAリガーゼの存在下で一緒に加える。得られた混合物を、この2つのフラグメントを連結するのに適した条件下で維持する。次に、連結混合物を使用し、細菌HB101を形質転換する。次に、それを、カナマイシンを含む寒天上にプレーティングし、ベクターが正確に挿入された目的の遺伝子を有することを確認する。

【 0 8 5 8 】

両種指向性 p A 3 1 7 または G P + a m 1 2 パッケージング細胞を、10% 仔ウシ血清 (C S) 、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M) 中、組織培養でコンフルエントな密度まで増殖させる。次に、その遺伝子を含む M S V ベクターを培地に加え、そしてパッケージング細胞をこのベクターで形質導入する。このとき、このパッケージング細胞は、その遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する (ここで、このパッケージング細胞をプロデューサー細胞という)。

【 0 8 5 9 】

形質導入されたプロデューサー細胞に新鮮な培地を添加し、次いでこの培地を 10 c m プレートのコンフルエントなプロデューサー細胞から採取する。感染性ウイルス粒子を含む使用済み培地を、ミリポアフィルターを通して濾過し、はがれたプロデューサー細胞を除去した後、この培地を使用して、線維芽細胞を感染させる。線維芽細胞のサブコンフルエントなプレートから培地を除去し、そしてプロデューサー細胞からの培地で速やかに置き換える。この培地を除去し、そして新鮮な培地と置き換える。ウイルスの力価が高ければ、実質的にすべての線維芽細胞が感染され、選択は必要ではない。力価が非常に低ければ、n e o または h i s のような選択マーカーを有するレトロウイルスベクターを使用することが必要である。一旦、線維芽細胞が効率的に感染したなら、その線維芽細胞を分析し、タンパク質が産生されているか否かを決定する。

【 0 8 6 0 】

次に、操作された線維芽細胞を、単独で、またはサイトデックス 3 マイクロキャリアピース上でコンフルエントに増殖させた後のいずれかで、宿主に移植する。

【 0 8 6 1 】

(実施例 14 : 内因性 P T P a s e 遺伝子を使用する遺伝子治療)

本発明に従う遺伝子治療の別の方法は、本発明の内因性 P T P a s e 遺伝子配列を、例えば、米国特許番号 5, 6 4 1, 6 7 0 (1997 年 6 月 24 日発行) ; 国際公開番号 W O 9 6 / 2 9 4 1 1 (1996 年 9 月 26 日公開) ; 国際公

開番号WO 94/12650 (1994年8月4日公開) ; K o l l e r ら、
P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 86 : 8932 ~ 8935 (1989) ; および Z i j l s t r a ら、N a t u r e , 342 : 435 ~ 438 (1989) に記載されるように、相同組換えを介してプロモーターに作動可能に結合する工程を包含する。この方法は、その標的細胞中に存在するが、その細胞中では発現されないかまたは所望されるよりも低いレベルで発現される、遺伝子の活性化を包含する。

【 0 8 6 2 】

プロモーターおよび標的化配列を含むポリヌクレオチド構築物を作製する。この標的化配列は、プロモーターに隣接する、内因性 P T P a s e 遺伝子の 5' 非コード配列に相同である。この標的化配列は、この P T P a s e 遺伝子の 5' 末端に十分に近く、その結果、このプロモーターは、相同組換えの際にこの内因性配列に作動可能に連結される。このプロモーターおよび標的化配列を、P C R を使用して増幅し得る。好ましくは、この増幅したプロモーターは、5' 末端および 3' 末端上に異なる制限酵素部位を含む。好ましくは、第 1 の標的化配列の 3' 末端は、増幅したプロモーターの 5' 末端と同じ制限酵素部位を含み、そして第 2 の標的化配列の 5' 末端は、増幅したプロモーターの 3' 末端と同じ制限部位を含む。

【 0 8 6 3 】

この増幅したプロモーターおよび増幅した標的化配列を、適切な制限酵素で消化し、続いて仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。消化したプロモーターおよび消化した標的化配列を、T 4 D N A リガーゼの存在下でともに加える。生じた混合物を、これら 2 つのフラグメントの連結に適切な条件下で維持する。この構築物をアガロースゲルでサイズ分画し、次いでフェノール抽出およびエタノール沈殿により精製する。

【 0 8 6 4 】

この実施例において、このポリヌクレオチド構築物を、エレクトロポレーションを介して裸のポリヌクレオチドとして投与する。しかし、このポリヌクレオチド構築物はまた、トランスフェクション促進剤 (例えば、リボソーム、ウイルス

配列、ウイルス粒子、沈殿剤など）とともに投与され得る。送達のこのような方法は、当該分野で公知である。

【 0 8 6 5 】

一旦、細胞をトランスフェクトすると、相同組換えが生じて、このプロモーターがこの内因性 P T P a s e 遺伝子配列に作動可能に連結される。これは、この細胞中におけるこの P T P a s e の発現を生じる。発現は、免疫学的染色または当該分野で公知の他の任意の方法により、検出され得る。

【 0 8 6 6 】

線維芽細胞を、皮膚生検により被験者から得る。得られた組織を、D M E M + 10 % ウシ胎仔血清中に配置する。対数増殖期または定常期初期の線維芽細胞を、トリプシン処理し、そしてプラスチックの表面から栄養培地でリンスする。細胞懸濁液のアリコートをし、計数のために取り出し、そして残りの細胞を遠心分離に供する。上清を吸引し、そしてペレットを 5 m l のエレクトロポレーション緩衝液 (20 m M H E P E S p H 7 . 3 , 137 m M N a C l , 5 m M K C l , 0 . 7 m M N a₂ H P O₄ , 6 m M デキストロース) に再懸濁する。この細胞を再遠心分離し、上清を吸引し、そして細胞をアセチル化ウシ血清アルブミン 1 m g / m l を含むエレクトロポレーション緩衝液に再懸濁する。この最終細胞懸濁物は、約 3×10^6 細胞 / m l を含む。エレクトロポレーションを、再懸濁直後に実施すべきである。

【 0 8 6 7 】

プラスミド D N A を、標準的技術に従って調製する。例えば、P T P a s e 遺伝子座に標的化するためのプラスミドを構築するために、プラスミド p U C 18 (M B I F e r m e n t a s , A m h e r s t , N Y) を H i n d I I I で消化する。C M V プロモーターを、5' 末端に X b a I 部位および 3' 末端に B a m H I 部位を備えて P C R により増幅する。2つの P T P a s e 非コード遺伝子配列を P C R を介して増幅する：一方の P T P a s e 非コード配列 (P T P a s e フラグメント 1) を、5' 末端に H i n d I I I 部位および 3' 末端に X b a I 部位を備えて増幅する；他方の P T P a s e 非コード配列 (P T P a s e フラグメント 2) を、5' 末端に B a m H I 部位および 3' 末端に H i n d I I I 部

位を備えて増幅する。このCMVプロモーターおよびPTPaseフラグメント(1および2)を、適切な酵素(CMVプロモーター-XbaIおよびBamHI; PTPaseフラグメント1-XbaI; PTPaseフラグメント2-BamHI)で消化し、そしてともに連結する。生じた連結生成物をHindIIIで消化し、そしてHindIIIで消化したpUC18プラスミドと連結する。

【0868】

プラスミドDNAを、0.4cmの電極ギャップを備える滅菌キュベット(Bio-Rad)に添加する。最終DNA濃度は、一般的に、少なくとも120 μ g/mlである。次いで、この細胞懸濁液の0.5ml(約 1.5×10^6 細胞を含む)をこのキュベットに添加し、そしてこの細胞懸濁液およびDNA溶液を、穏やかに混合する。エレクトロポレーションを、Gene-Pulser装置(Bio-Rad)を用いて実施する。キャパシタンスおよび電圧を、それぞれ、960 μ Fおよび250~300Vに設定する。電圧が増加すると、細胞の生存が減少するが、導入されたDNAをそのゲノム中に安定に組込む生存細胞の割合が劇的に増加する。これらのパラメーターを考慮すると、パルス時間約14~20mSecが観察されるはずである。

【0869】

エレクトロポレーションした細胞を、室温で約5分間維持し、次いで、このキュベットの中身を、滅菌した移動ピペットを用いて穏やかに取り出す。この細胞を、1.0cmのディッシュ中の、予め温めた栄養培地(15%仔ウシ血清を含むDMEM)10mlに直接加え、そして37℃でインキュベートする。翌日、この培地を吸引し、そして10mlの新鮮な培地で置換し、そしてさらに16~24時間インキュベートする。

【0870】

次いで、操作された線維芽細胞を、宿主中に、単独か、またはサイトデックス(cytodex)3マイクロキャリア(microcarrier)ビーズ上でコンフルエントになるまで増殖させた後かのいずれかで、注入する。ここで、この線維芽細胞は、タンパク質産物を生成する。次いで、この線維芽細胞を、上

記のような患者に導入し得る。

【 0 8 7 1 】

(実施例 15 : 遺伝子治療を使用する処置方法－インビボ)

本発明の別の局面は、障害、疾患、および状態を処置するためにインビボ遺伝子治療方法を使用することである。この遺伝子治療法は、PTPaseポリペプチドの発現を増大または減少させるための、動物への裸の核酸(DNA、RNA、およびアンチセンスDNAまたはRNA) PTPase配列の導入に関する。PTPaseポリヌクレオチドは、プロモーター、または標的組織によるPTPaseポリペプチドの発現に必要な任意の他の遺伝子エレメントに、作動可能に連結され得る。このような遺伝子治療および送達の方法および技術は、当該分野で公知であり、例えば、WO90/11092、WO98/11779；米国特許第5693622号、同第5705151号、同第5580859号；Tabataら、Cardiovasc. Res. 35(3) : 470-479 (1997)；Chaoら、Pharmacol. Res. 35(6) : 517-522 (1997)；Wolff、Neuromuscul. Disord. 7(5) : 314-318 (1997)、Schwartzら、Gene Ther. 3(5) : 405-411 (1996)；Tsurumi Y. ら、Circulation 94(12) : 3281-3290 (1996) (本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。

【 0 8 7 2 】

PTPaseポリヌクレオチド構築物は、注入可能な物質を動物の細胞に送達する任意の方法(例えば、組織(心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓、腸など)の間隙空間への注入)によって送達され得る。PTPaseポリヌクレオチド構築物は、薬学的に受容可能な液体または水性キャリア中で送達され得る。

【 0 8 7 3 】

用語「裸の」ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAは、細胞への侵入を補助、促進、または容易にするように作用するいかなる送達ビヒクル(ウイルス配列、ウイルス粒子、リボソーム処方物、リボフェクチン、または沈澱剤などを含む)も含まない配列をいう。しかし、PTPaseポリヌクレオチドはまた、当業

者に周知の方法によって調製され得るリボソーム処方物（例えば、F e l g n e r ら A n n . N Y A c a d . S c i . , 7 7 2 : 1 2 6 - 1 3 9 (1 9 9 5) および A b d a l l a h ら B i o l . C e l l 8 5 (1) : 1 - 7 (1 9 9 5) で教示されたもの）中で送達され得る。

【 0 8 7 4 】

この遺伝子治療方法において使用される P T P a s e ポリヌクレオチドベクター構築物は、好ましくは、宿主ゲノムに組み込まれず、複製を可能にする配列も含まない構築物である。当業者に公知の任意の強力なプロモーターが、DNAの発現を駆動するために用いられ得る。他の遺伝子治療技術とは異なり、裸の核酸配列を標的細胞に導入する1つの主要な利点は、その細胞におけるポリヌクレオチド合成の一過性の性質である。研究によって、非複製DNA配列が細胞に導入されて、6ヶ月までの間の期間、所望のポリペプチドの産生を提供し得ることが示された。

【 0 8 7 5 】

ポリヌクレオチド構築物を、動物内の組織（筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺、および結合組織を含む）の間隙空間に送達され得る。組織の間隙空間は、細胞間液、器官組織の細網線維間のムコ多糖マトリクス、血管または室の壁における弾性線維、線維性組織のコラーゲン線維、あるいは筋肉細胞を囲む結合組織内の同じマトリクス（t h a t s a m e m a t r i x）または骨の裂孔中の結合組織内の同じマトリクス（t h a t s a m e m a t r i x）を含む。これは、同様に、循環の血漿およびリンパチャンネルのリンパ液により占められた空間である。筋肉組織の間隙空間への送達は、以下に記載の理由のために好ましい。このポリヌクレオチド構築物を、これらの細胞を含む組織への注射によって、好都合に送達し得る。このポリヌクレオチド構築物は、好ましくは、持続性の分化した非分裂細胞に送達され、その細胞において発現されるが、送達および発現は、非分化細胞または完全には分化していない細胞（例えば、血液の幹細胞または皮膚線維芽細胞）において達成され得る。インビボ筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、そしてこのポリヌクレオ

チドを発現する能力において、特に適格である。

【 0 8 7 6 】

裸の P T P a s e ポリヌクレオチド注射のために、D N A または R N A の有効投薬量は、約 0 . 0 5 g / k g 体重 ~ 約 5 0 m g / k g 体重の範囲にある。好ましくは、投薬量は、約 0 . 0 0 5 m g / k g ~ 約 2 0 m g / k g であり、そしてより好ましくは、約 0 . 0 5 m g / k g ~ 約 5 m g / k g である。もちろん、当業者が認識するように、この投薬量は、注射の組織部位に従って変動する。核酸配列の適切かつ有効な投薬量は、当業者によって容易に決定され得、そして処置される状態および投与経路に依存し得る。好ましい投与経路は、組織の間隙空間への非経口注射経路によってである。しかし、他の非経口経路もまた用いられ得、これには、例えば、特に肺または気管支組織、咽喉または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル処方物の吸入が挙げられる。さらに、裸の P T P a s e ポリヌクレオチド構築物を、血管形成術の間にこの手順において用いられるカテーテルによって動脈に送達し得る。

【 0 8 7 7 】

インビボでの筋肉における注射された P T P a s e ポリヌクレオチドの用量応答効果を、以下のようにして決定する。P T P a s e ポリペプチドをコードする m R N A の生成のために適切な P T P a s e 鋳型 D N A を、標準的な組換え D N A 方法論に従って調製する。鋳型 D N A (これは環状または直鎖状のいずれかであり得る) を裸の D N A として使用するか、またはリボソームと複合体化するかのいずれかを行う。次いで、マウスの四頭筋に、多様な量のこの鋳型 D N A を注射する。

【 0 8 7 8 】

5 ~ 6 週齢の雌性および雄性の B a l b / C マウスに、0 . 3 m l の 2 . 5 % A v e r t i n を腹腔内注射することにより麻酔する。1 . 5 c m の切開を大腿前部で行い、そして四頭筋を直接可視化する。P T P a s e 鋳型 D N A を、0 . 1 m l のキャリアに入れて、1 c c 注射器で 2 7 ゲージ針を通して 1 分間にわたって、この筋肉の遠位挿入部位から約 0 . 5 c m の位置で膝に、約 0 . 2 c m の深さで注射する。縫合を、将来の位置確認のために注射部位の上で行い、そして

皮膚をステンレス鋼クリップで閉じる。

【0879】

適切なインキュベーション時間（例えば、7日）後、筋肉抽出物を、四頭全体を切り出すことによって調製する。個々の四頭筋の5枚目毎の15 μ m切片を、PTPaseタンパク質発現について組織化学的に染色する。PTPaseタンパク質発現についての時間経過は、異なるマウスから四頭筋を異なる時間に採取すること以外は、同様な様式で行い得る。注射後の筋肉中のPTPaseのDNAの持続性を、注射したマウスおよびコントロールマウスから総細胞性DNAおよびHIRT上清を調製した後、サザンブロット分析によって決定し得る。マウスにおける上記実験の結果は、裸のPTPaseDNAを用いて、ヒトおよび他の動物において適切な投薬量および他の処置パラメーターを推定するために使用し得る。

【0880】

（実施例16：抗体の産生）

a) ハイブリドーマ技術

本発明の抗体を、種々の方法によって調製し得る。（Current Protocols、第2章を参照のこと）。このような方法の1つの例として、PTPaseポリペプチドを発現する細胞を、ポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導するために、動物に投与する。好ましい方法において、PTPaseポリペプチドの調製物を調製し、そしてその調製物が、天然の夾雑物を実質的に含まないようにするために精製する。ついで、このような調製物を、より大きな比活性のポリクローナル抗体を産生するために、動物に導入する。

【0881】

PTPaseポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を、ハイブリドーマ技術を使用して調製する（Kohlerら、Nature 256:495（1975）；Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6:511（1976）；Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6:292（1976）；Hammerlingら：Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas、Elsevier、N. Y.、5

63～681頁(1981))。一般的に、動物(好ましくは、マウス)を、PTPaseポリペプチドまたはより好ましくは分泌PTPaseポリペプチド発現細胞で、免疫する。このようなポリペプチド発現細胞を、適切な任意の組織培養培地(好ましくは、10%ウシ胎仔血清(約56℃にて不活化)を補充し、そして約10g/lの非必須アミノ酸、約1,000U/mlのペニシリン、および約100μg/mlのストレプトマイシンを補充した、Earle's改変Eagle's培地)にて培養する。

【0882】

このようなマウスの脾細胞を抽出し、そして適切な骨髓腫細胞株と融合させる。適切な任意の骨髓腫細胞株を、本発明に従って使用し得るが、しかし、親骨髓腫細胞株(SP20)(ATCCから入手可能)を使用することが好ましい。融合後、生じたハイブリドーマ細胞を、HAT培地にて選択的に維持し、ついで、Wandsら(Gastroenterology 80:225～232(1981))により記載されるように、限界希釈によってクローン化する。ついで、このような選択を介して得たハイブリドーマ細胞をアッセイして、PTPaseポリペプチドを結合し得る抗体を分泌するクローンを同定する。

【0883】

あるいは、PTPaseポリペプチドに結合し得るさらなる抗体を、抗イディオタイプ抗体を使用して2段階工程の手順において生成し得る。このような方法は、抗体それ自体が抗原であり、それゆえ第二の抗体に結合する抗体を得ることが可能であるという事実を利用する。この方法に従って、タンパク質特異的抗体を使用して、動物(好ましくは、マウス)を免疫する。次いで、このような動物の脾細胞を使用して、ハイブリドーマ細胞を産生する。そして、このハイブリドーマ細胞は、PTPaseタンパク質特異的抗体に結合する能力がPTPaseポリペプチドによってブロックされ得る抗体を産生するクローンを同定するためにスクリーニングされる。このような抗体は、PTPaseタンパク質特異的抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、そして動物を免疫してさらなるPTPaseタンパク質特異的抗体の形成を誘導するために使用される。

【0884】

ヒトにおける抗体のインビボ使用のために、抗体は、「ヒト化」される。このような抗体は、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞に由来する遺伝的構築物を使用することによって産生され得る。キメラ抗体およびヒト化抗体を産生するための方法は当該分野で公知であり、そして本明細書に議論される（総説については、M o r r i s o n, S c i e n c e 229:1202 (1985) ; O i ら、B i o T e c h n i q u e s 4:214 (1986) ; C a b i l l y ら、米国特許第4,816,567号 ; T a n i g u c h i ら、E P 171496 ; M o r r i s o n ら、E P 173494 ; N e u b e r g e r ら、W O 8601533 ; R o b i n s o n ら、W O 8702671 ; B o u l i a n n e ら、N a t u r e 312:643 (1984) ; N e u b e r g e r ら、N a t u r e 314:268 (1985) を参照のこと）。

【0885】

(b) s c F v のライブラリーからの P T P a s e ポリペプチドに対して指向される抗体フラグメントの単離)

ヒト P B L から単離した天然に存在する V 遺伝子を、P T P a s e ポリペプチド（ドナーは、これらに対して曝露されていても曝露されていなくともよい）に対する反応性を含む抗体フラグメントのライブラリーに構築する（例えば、米国特許第5,885,793号（その全体が参考として本明細書に援用される）を参照のこと）。

【0886】

(ライブラリーのレスキュー (r e s c u e))

P C T-公開 W O 92/01047 に記載のように、ヒト P B L の R N A から s c F v のライブラリーを構築する。抗体フラグメントを提示するファージをレスキューするため、ファージミドを保有する約 10^9 個の E. c o l i を用いて、50 ml の $2 \times T Y$ (1% グルコースおよび $100 \mu g / m l$ のアンピシリンを含有する) ($2 \times T Y - A M P - G L U$) を接種し、そして振盪しながら 0.8 の O. D. まで増殖させる。この培養物の 5 ml を用いて 50 ml の $2 \times T Y - A M P - G L U$ に接種し、 2×10^8 T U の Δ 遺伝子 3 ヘルパー (M13 Δ 遺

伝子 I I I、P C T 公開 W O 9 2 / 0 1 0 4 7 を参照のこと) を添加し、そして培養物を振盪なしで 3 7 ° C で 4 5 分間インキュベートし、次いで振盪しながら 3 7 ° C で 4 5 分間インキュベートする。この培養物を 1 0 分間 4 0 0 0 r . p . m . で遠心分離し、そしてペレットを 2 リットルの 2 × T Y (1 0 0 μ g / m l アンプシリンおよび 5 0 μ g / m l カナマイシンを含有する) 中に再懸濁し、そして一晩増殖させる。ファージを P C T 公開 W O 9 2 / 0 1 0 4 7 に記載のように調製する。

[0 8 8 7]

M 1 3 Δ 遺伝子 I I I を以下のように調製する: M 1 3 Δ 遺伝子 I I I ヘルパーファージは、遺伝子 I I I タンパク質をコードしない。それゆえ、抗体フラグメントを提示するファージ (ファージミド) は、抗原に対するより大きい結合アビディティを有する。ファージ形態形成の間、野生型遺伝子 I I I タンパク質を供給する p U C 1 9 誘導体を保有する細胞においてヘルパーファージを増殖させることにより、感染性 M 1 3 Δ 遺伝子 I I I 粒子を作製する。培養物を振盪なしで 3 7 ° C で 1 時間インキュベートし、次いで振盪しながら 3 7 ° C でさらに 1 時間インキュベートする。細胞を遠心沈殿 (I E C - C e n t r a 8 , 4 0 0 r . p . m . で 1 0 分間) し、1 0 0 μ g / m l のアンプシリンおよび 2 5 μ g / m l のカナマイシンを含有する 2 × T Y プロス (2 × T Y - A M P - K A N) 3 0 0 m l 中で再懸濁し、そして 3 7 ° C で振盪しながら一晩増殖させた。ファージ粒子を、2 回の P E G 沈殿 (S a m b r o o k ら、1 9 9 0) により培養培地から精製および濃縮し、2 m l P B S に再懸濁し、そして 0 . 4 5 μ m のフィルター (M i n i s a r t N M L ; S a r t o r i u s) を通過させ、約 1 0¹² 形質導入単位 / m l (アンプシリン耐性クローン) の最終濃度を得る。

[0 8 8 8]

(ライブラリーのパニング)

I m m u n o t u b e s (N u n c) を、本発明のポリペプチドの 1 0 0 μ g / m l または 1 0 μ g / m l のいずれかの 4 m l を用いて P B S 中で一晩コーティングする。チューブを 2 % M a r v e l - P B S を用いて 3 7 ° C で 2 時間ブロックし、次いで P B S 中で 3 回洗浄する。約 1 0¹² T U のファージをチューブ

に適用し、そして、回転盤上で上下にタンプリングしながら室温で30分間インキュベートし、次いでさらに1.5時間静置しておく。チューブをPBS、0.1% Tween-20で10回、そしてPBSで10回洗浄する。1mlの100mM トリエチルアミンを添加し、そして回転盤上で15分間上下に回転させることによりファージを溶出し、その後この溶液を0.5mlの1.0M Tris-HCl, pH 7.4で直ちに中和する。次いで、溶出したファージを細菌とともに37℃で30分間インキュベートすることにより、ファージを用いて、10mlの対数増殖中期のE. coli TG1に感染させる。次いで、E. coliを1% グルコースおよび100 μ g/ml アンピシリンを含有するTYEプレート上にプレーティングする。次いで、得られる細菌ライブラリーを、上記のように Δ 遺伝子3 ヘルパーファージでレスキューし、次の回の選択のためのファージを調製する。次いで、このプロセスを、アフィニティー精製の全4回について反復し、3回目および4回目にはチューブ洗浄をPBS、0.1% Tween-20で20回、そしてPBSで20回に増加する。

【0889】

(バインダーの特徴付け)

第3回目および4回目の選択から溶出したファージを用いて、E. coli HB 2151を感染させ、そして可溶性 scFv をアッセイのために単一コロニーから生成する (Marksら、1991)。50mM 炭酸水素塩、pH 9.6 中の本発明のポリペプチドの10 μ g/ml のいずれかでコーティングしたマイクロタイタープレートを用いてELISAを実施する。ELISAにおける陽性クローンをPCRフィンガープリンティング (例えば、PCT公開WO 92/01047を参照のこと)、次に配列決定することによりさらに特徴付ける。これらの陽性クローンはまた、当業者に公知の技術によって特徴付けされ得る (例えば、エピトープマッピング、結合アフィニティー、レセプターシグナル変換、抗体/抗原結合をブロックするか、または競合的に阻害する能力、および競合的なアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性)。

【0890】

(実施例17: ホスファターゼ活性についてのアッセイ)

プロテインチロシンホスファターゼ (PTPase) 活性についてアッセイするために、Nishikawaらのアッセイを利用する (Nishikawa, Yら、J. Biol. Chem., 274:34803~810 (1999))。簡単には、PTPase活性をNew England Biolabs, Inc. からのPTPaseキットを使用して測定する。PTPaseのための基質であるミエリン塩基性タンパク質を、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ の存在下でAb1タンパク質チロシンキナーゼを用いて複数のチロシン残基でリン酸化する。次いで、残留ATPを取り除くために一晚透析する。このアッセイを25 μl の反応液中で行う。基質を加える前に、本発明の精製したプロテインチロシンホスファターゼ (5 ng/反応) を化合物と共に30℃で30分間ブレインキュベートする。次に、反応液を $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ で標識したミエリン塩基性タンパク質 (約1.5 μg /反応) とともに30℃で20分間インキュベートする。反応を200 μl の20%トリクロロ酢酸の添加により停止させる。次に、このサンプルを遠心分離し、そして上清中の放射能をシンチレーションカウンターを使用してカウントする。

【0891】

(実施例18：プロテインチロシンホスファターゼと他のタンパク質との相互作用)

本発明の精製されたプロテインチロシンホスファターゼは、さらに相互作用するタンパク質もしくはレセプタータンパク質、または他のシグナル伝達経路タンパク質の同定、特徴付けおよび精製についての検索ツールである。簡単には、本発明の標識されたプロテインチロシンホスファターゼは、相互作用する分子の精製のための試薬として有用である。親和性精製の1つの実施形態において、プロテインチロシンホスファターゼは、クロマトグラフィーカラムに共有結合する。推定の標的細胞由来の無細胞抽出物 (例えば、神経細胞または肝細胞) をカラムに通し、そして適切な親和性を有する分子は、プロテインチロシンホスファターゼと結合する。プロテインチロシンホスファターゼ複合体をカラムから回収し、分離し、そして回収された分子をN末端タンパク質配列決定に供する。次に、アミノ酸配列を使用して、捕捉分子を同定するかまたは適切なcDNAライブラリ

ーから関連する遺伝子をクローニングするための縮重オリゴヌクレオチドプローブを設計する。

【 0 8 9 2 】

本発明が前述の説明および実施例において詳細に記載される以外にも実施され得ることは明らかである。本発明の多数の改変およびバリエーションが、上記の教示を考慮して可能であり、従って、添付の特許請求の範囲内である。

【 0 8 9 3 】

発明の背景、詳細な説明、および実施例において引用される各書類（特許、特許出願、雑誌文献、要約、実験室マニュアル、書籍、または他の開示を含む）の全体の開示が、これによって、本明細書中で参考として援用される。さらに、本明細書と共に提出される配列表のハードコピーおよび対応するコンピューターで読み取り可能な形式は、両方ともその全体が参考として本明細書中にて援用される。

【 0 8 9 4 】

本発明の特定の P T P a s e ポリヌクレオチドおよびポリペプチド（抗体を含む）は、米国仮出願番号第 6 0 / 1 7 6 , 3 0 6 号および米国仮出願番号第 6 0 / 1 8 9 , 8 8 1 号（これは、その全体が参考として本明細書中に援用される）に開示された。

【 0 8 9 5 】

【表 6】

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13規則の2)

A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

19 頁.

N/A 行

B. 寄託物の表示

その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 ☐

寄託機関の名称

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

寄託機関の住所（郵便番号および国を含む）

アメリカ合衆国

バージニア 20110-2209、マナサス

ユニバーシティ フールバード 10801

寄託日

2000年3月3日

受託番号

PTA-1452

C. 追加の表示（なければ空白のまま）

この情報は追加の用紙に続く ☐

D. 表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

欧州

欧州特許が求められるこれらの指定機関に関して、寄託された微生物の試料は、欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる日まで、請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能になる。（EPC規則28(4)）

E. 別に添付する表示物（なければ空白のまま）

下記の表示物は、並って国際事務局に提出する（表示物の一般の性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

受理官庁記入欄

国際事務局記入欄

☒ この用紙は国際出願とともに受理された

☐ この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された

認定官

認定官

PCI/RO/134様式 (1992年7月)

A T C C 寄託番号 P T A - 1 4 5 2

(カナダ)

出願人は、出願に基づきカナダ国特許が発行されるか、あるいは同出願が拒絶または放棄されて回復され得なくなるかもしくは取り下げられるまでは、特許庁長官（Commissioner of Patents）が、長官により指名された独立の専門家に対してのみ出願中で言及された寄託済みの生物学的材料の

サンプルの供与を許可する旨を請求し、出願人は、国際出願の公表のための規則上の準備が完了する前に、書面によりその旨を国際事務局に告知しなければならない。

【 0 8 9 6 】

(ノ ル ウ ェ ー)

出願人はここにおいて、出願が（ノルウェー特許庁により）公開に付されるかあるいは公開を経ずにノルウェー特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、ノルウェー特許法第22条および第33条（3）に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりノルウェー特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、ノルウェー特許庁により作成された公認専門家のリスト（list of recognized experts）に記載された任意の者か、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【 0 8 9 7 】

(オーストラリア)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は、特許の付与前において、あるいは出願の放棄（l a p s i n g）、拒絶あるいは取り下げ前において、発明に対し利害関係を有さない当業者である対象者（s k i l l e d a d d r e s s e e）に対してのみ行われる旨を、告知するものである（オーストラリア国特許法第3.25（3）号規定）。

【 0 8 9 8 】

(フ ィ ン ラ ン ド)

出願人はここにおいて、出願が（特許および統制委員会（National Board of Patents and Regulations）により）公開に付されるかあるいは公開を経ずに国立特許および法規委員会による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。

【 0 8 9 9 】

(英国)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は専門家に対してのみ利用可能にされる旨を、請求する。この旨の請求は、出願の国際公表のための規則上の準備が完了する前に、出願人により国際事務局に対してなされなければならない。

A T C C 寄託番号 P T A - 6 2 2

(デンマーク)

出願人はここにおいて、出願が（デンマーク特許庁により）公開に付されるかあるいは公開を経ずにデンマーク特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、デンマーク特許法第22条および第33条（3）に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりデンマーク特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、デンマーク特許庁により作成された公認専門家のリスト（list of recognized experts）に記載された任意の者か、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【 0 9 0 0 】

(スウェーデン)

出願人はここにおいて、出願が（スウェーデン特許庁により）公開に付されるかあるいは公開を経ずにスウェーデン特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、優先日から16ヶ月が経過するよりも前に、出願人により国際事務局に対してなされるものとする（好ましくはPCT Applicant's GuideのVolume Iのannex Zに記載された書式PCT/RO/134による）。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、スウェーデン特許庁により作成された公認専門家のリスト（lis

t o f r e c o g n i z e d e x p e r t s) に記載された任意の者か、
あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【 0 9 0 1 】

(オランダ)

出願人はここにおいて、オランダ特許の発行日まで、あるいは出願が拒絶、取り下げあるいは放棄 (l a p s e d) される日までは、特許法 3 1 F (1) の規定に基づき、微生物は専門家へのサンプル供与の形でのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、オランダ王国特許法の第 2 2 C 条または第 2 5 条に基づき出願が公に利用可能にされる日のうちいずれか早い方の日付よりも前に、出願人によりオランダ工業所有権局に対して提出されるものとする。

【 0 9 0 2 】

【表 7】

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13規則の2)

A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

20 頁、

N/A 行

B. 寄託物の表示

その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 ☐

寄託機関の名称

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

寄託機関の住所 (郵便番号および国を含む)

アメリカ合衆国

バージニア 20110-2209、マナサス

ユニバーシティ プールバード 10801

寄託日

2000年3月13日

受託番号

PTA-1477

C. 追加の表示 (なければ空白のまま)

この情報は追加の用紙に続く ☐

D. 表示がなされた指定締結国 (全ての指定締結国に対する表示ではない場合)

欧州

欧州特許が求められるこれらの指定機関に関して、寄託された微生物の試料は、欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる日まで、請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能になる。(EPC規則28(4))

E. 別に添付する表示物 (なければ空白のまま)

下記の表示物は、通って国際事務局に提出する(表示物の一般性性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定)

受理官庁記入欄

国際事務局記入欄

この用紙は西暦出願とともに受理された

☐ この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された

認定官

認定官

PCT/RO/134様式 (1992年7月)

ATCC 寄託番号 PTA-1477

(カナダ)

出願人は、出願に基づきカナダ国特許が発行されるか、あるいは同出願が拒絶または放棄されて回復され得なくなるかもしくは取り下げられるまでは、特許庁長官 (Commissioner of Patents) が、長官により指名された独立の専門家に対してのみ出願中で言及された寄託済みの生物学的材料の

サンプルの供与を許可する旨を請求し、出願人は、国際出願の公表のための規則上の準備が完了する前に、書面によりその旨を国際事務局に告知しなければならない。

【 0 9 0 3 】

(ノルウェー)

出願人はここにおいて、出願が（ノルウェー特許庁により）公開に付されるかあるいは公開を経ずにノルウェー特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、ノルウェー特許法第22条および第33条（3）に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりノルウェー特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、ノルウェー特許庁により作成された公認専門家のリスト（list of recognized experts）に記載された任意の者か、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【 0 9 0 4 】

(オーストラリア)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は、特許の付与前において、あるいは出願の放棄（l a p s i n g）、拒絶あるいは取り下げ前において、発明に対し利害関係を有さない当業者である対象者（s k i l l e d a d d r e s s e e）に対してのみ行われる旨を、告知するものである（オーストラリア国特許法第3.25（3）号規定）。

【 0 9 0 5 】

(フィンランド)

出願人はここにおいて、出願が（特許および統制委員会（N a t i o n a l B o a r d o f P a t e n t s a n d R e g u l a t i o n s）により）公開に付されるかあるいは公開を経ずに国立特許および法規委員会による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。

【 0 9 0 6 】

(英国)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は専門家に対してのみ利用可能にされる旨を、請求する。この旨の請求は、出願の国際公表のための規則上の準備が完了する前に、出願人により国際事務局に対してなされなければならない。

A T C C 寄託番号 P T A - 6 2 2

(デンマーク)

出願人はここにおいて、出願が（デンマーク特許庁により）公開に付されるかあるいは公開を経ずにデンマーク特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、デンマーク特許法第22条および第33条（3）に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりデンマーク特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、デンマーク特許庁により作成された公認専門家のリスト（list of recognized experts）に記載された任意の者か、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【 0 9 0 7 】

(スウェーデン)

出願人はここにおいて、出願が（スウェーデン特許庁により）公開に付されるかあるいは公開を経ずにスウェーデン特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、優先日から16ヶ月が経過するよりも前に、出願人により国際事務局に対してなされるものとする（好ましくはPCT Applicant's GuideのVolume Iのannex Zに記載された書式PCT/RO/134による）。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、スウェーデン特許庁により作成された公認専門家のリスト（lis

t o f r e c o g n i z e d e x p e r t s) に記載された任意の者か、
あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【 0 9 0 8 】

(オランダ)

出願人はここにおいて、オランダ特許の発行日まで、あるいは出願が拒絶、取り下げあるいは放棄 (l a p s e d) される日までは、特許法 3 1 F (1) の規定に基づき、微生物は専門家へのサンプル供与の形でのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、オランダ王国特許法の第 2 2 C 条または第 2 5 条に基づき出願が公に利用可能にされる日のうちいずれか早い方の日付よりも前に、出願人によりオランダ工業所有権局に対して提出されるものとする。

【 配 列 表 】

<110> Human Genome Sciences, Inc.

<120> Protein Tyrosine Phosphatase Polynucleotides, Polypeptides, and Antibodies

<130> PT050PCT

<140> Unassigned

<141> 2001-02-22

<150> 60/186,658

<151> 2000-03-03

<150> 60/189,881

<151> 2000-03-16

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 733

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gggatccgga	gccccaatct	tctgacaaaa	ctcacacatg	cccaccgtgc	ccagcacctg	60
aattcgaggg	tgcaccgtca	gtcttctctt	tccccccaaa	acccaaggac	accctcatga	120
tctcccggac	tcttgaggtc	acatgcgtgg	tggtggacgt	aagccacgaa	gaccctgagg	180
tcaagttcaa	ctggtacgtg	gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	240
aggagcagta	caacagcacg	taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	300
ggctgaatgg	caaggagtac	aagtgcgaag	tctccaacaa	agccctccca	accccoatcg	360
agaaaaccat	ctccaaagcc	aaagggcagc	cccagagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	420
catcccggga	tgagctgacc	aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctgggtc	aaaggcttct	480
atccaagcga	catcgccgtg	gagtgaggga	gcaatgggca	gccggagAAC	aactacaaga	540
ccacgcctcc	cgtgctggac	tccgacggct	ccttcttctt	ctacagcaag	ctcaccgtgg	600
acaagagcag	gtggcagcag	gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	660
acaaccacta	cacgcagaag	agcctctccc	tgtctccggg	taaagtagtg	cgacggccgc	720
gactctagag	gat					733

<210> 2

<211> 1832

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggcacgaggt	atgatatcat	gcaggaattt	atggcttttag	aacttaagaa	totgcctggt	60
gagttcaact	ctgggaatca	accaagcaac	agagaaaaaa	acagataacg	agatattctt	120
ccatttcaac	atcatggata	tagtggccca	aatgagagaa	caacgtttotg	gcatggttca	180
aacgaaggag	cagtatcact	tttgttacga	tattgtgctt	gaagttcttc	ggaaacttct	240
gactttggat	taagaaagac	ttctgttgcc	tctcacttga	aattaccaag	tgggtttgca	300
cctcctcata	aagaacatgt	ttgcactgtg	ctgaagggtc	ttgctatgca	tacaatctgc	360
tttcttggtt	tatcagttta	ttttctttct	aaaagctccc	tgaagggtcaa	tatcatttgg	420
cttgggggtga	tcagtgttta	cttattgatc	ttgctaggca	atatcaaaat	aaottcccac	480
attttccagt	gaaacagatg	ttacataaaa	cgattgcagc	ttggctattt	ggttgaaggg	540
attacagagc	ccaataaagg	atttaaaata	tattcattaa	gattttattt	ggaaaggtgg	600

ctggagagag	ctgaggattt	ccaggacttt	gtaagttctt	attctgggag	aacataaggc	660
caataatcat	gacctcttcc	aggcattttt	aagacagatg	tctattcatg	ttctttagct	720
agagcctgta	ctttttgctg	gcatttgaat	aaccagttt	aaaaagagtc	cagttagggt	780
ggactaactt	tggacacaaa	ttggcttcca	ttcctacat	tttcatactg	ctgccttcct	840
acagctgcta	gaccaagacc	tgttggtctg	ggaagcattt	catggatagg	gagagctcct	900
ctcgggtgaac	agtcctaaac	taaaatagat	gtttatatag	aaagcccaag	aggagacttt	960
tgccatgcct	gagttctttc	ctatcccacc	ctaacactta	acatattact	tagtctgttt	1020
tgttaaaagc	aagtattacc	tttaacttgc	ctcttactct	ttgccttcta	gctaactaat	1080
aaagtttgat	ataggcatta	ttatataatt	ctgagtcatt	catggatctt	ctcatgtttg	1140
atgtattttt	caaaactaaga	tctatgatat	tttttttcc	agagttccat	taaatcattt	1200
atttccttta	ctttctcacc	tctgttgaaa	catttagaaa	ctggatttgg	gaaccaatt	1260
ttggaaaacc	agattcatag	tcatgaaaat	ggaaacttcc	atattctgtt	tttgaaaaga	1320
tgtggccatt	attacagtaa	ttttattata	ggactttgcc	tctgacaatt	aatagtata	1380
ttttggacaa	tgagttctgg	tgacaagcta	tacctaat	taagctataa	aacaatagat	1440
atgagtggtt	gtacagttta	actcaatgga	gatcagaata	ttctatgtat	tgagaaaatg	1500
tttaatatca	atctataaat	cttgaatttc	taagaggctt	attttgttct	tttggctgaa	1560
tgaagtattt	tgaattgggt	gaataattaa	taattctcat	tgtaaaaata	attatatgcc	1620
aaaaatatat	ttgatgttaa	atcaaataga	tgattctgtt	tacattgttc	atatgaataa	1680
taatctgtgt	taatttcatt	ttgataattg	gcctttaata	tttgtatctc	taattttatt	1740
ttctctctgt	tactgtaaaa	taatagctat	aatgtataac	aattttcttc	agaagaattc	1800
catgctatta	ttaaaataaa	atatttactg	tg			1832

<210> 3

<211> 1627

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ccacgcgtcc	gctggaagca	gtatcgccga	gaagaaagca	tctgggggtt	tccaggaaac	60
acaaacgcag	acagtgtgtg	cactacagac	tccagcctcc	ctttgaagcc	aggttcctgc	120
gctttctccc	tttagcotgg	aaccccaggg	gcaggattgg	gatggcgatc	gaagtgtacg	180
gatgtgcata	taaatctgag	gtggtttatt	ttgatggaca	aagtgtctctg	ctgtatacac	240
ttgataaaaa	acotttaaaa	ccaataagag	atgttatttc	tttgaaattt	aaagccatgc	300
agagcaatgg	aattctactt	cacagagaag	gacaacatgg	aaatcacatt	actctggaat	360
taattaaagg	aaagcttgtc	tttttctta	attcaggcaa	tgctaagctg	ccttccacta	420
ttgtctctgt	gaccctcacc	ctgggcagcc	tgctggatga	ccagcaactg	cattccgtcc	480
tcatcgagct	cctccacacg	caggtcaact	tcaccgtgga	caaacacact	catcatttcc	540
aagcaaaagg	agattccagt	aacttggatc	ttaattttga	gatcagcttt	gggggaattc	600
cgacaccogg	aagatcgcg	gcattcacac	gtaaaagctt	tcatgggtgt	ttagaaaatc	660
tttattataa	tggagtggat	gttaccgaat	tagccaagaa	acacaaacca	cagatcctca	720
tgatgggaaa	tgtgtccttc	tcatgtccac	agccacagac	tgtccctgtg	acttttctga	780
gctccaggag	ttatctggct	ctgccaggca	actctgggga	ggacaaagtg	tctgtcactt	840
ttcaattttg	aacgtggaac	agagcaggac	atttgctttt	cggcgaactt	caacgtggtt	900
cagggagttt	cgtcctcttt	cttaaggatg	gcaagctcaa	actgagcttc	ttccaggcgg	960
gacagtcacc	aagggaatgtc	acagcaggtg	ctggattaaa	cgatgggcag	tggcactctg	1020
tgctcctctc	tgccaagtgg	agccatatga	atgtggtggt	ggacgatgac	acagctgttc	1080
agcccttggt	ggctgtgctc	attgattcag	gtgacaccta	ttatttttga	ggctgcctgg	1140
gcaacagctc	tggctctgga	tgtaaaagcc	ccctgggagg	atttcagggc	tgcctaaggc	1200
tcatcaccat	tggtgacaaa	gggtggatc	ccatcttagt	acagcagggg	tcctggggag	1260
tttcagggac	ctccagatag	actcctgcgg	catcacagac	agactccgcg	tggacgggtg	1320
tgcggcacgg	tggcccgac	gcggtgaccc	tcggaggtgc	ccccagcggg	caccgcgct	1380
cggctgtgtc	cttcgcgtac	gcagcgggcg	cggggcagct	gcgggcccgc	gtgaacctgg	1440
cggagcgctg	cgagcagcgg	ctggctctgc	gctgcgggac	agcgcggcgc	ccggactcac	1500
gagatggaac	cocactgagc	tgggtgtgtg	gaagaaccaa	tgaaacacac	acttactggg	1560
gaggttctct	gcctgatgct	caaaagtgtg	cttgtggatt	agaggggaac	ctagtcttag	1620
atcgcg						1627

<210> 4
 <211> 1573
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 ggcacgagtt tgggggagcc caataaatgt gaacatggga tctgtcacgg gagctgtcct 60
 caagacgcta cttctgttat ctactcaaaa ttggaacaga gtcgagctg ggaattccta 120
 tgactgtgat gatcctcttg tgtctgcctt gcctcaggca tccttcagca gttctctccga 180
 gctctccagc agtcatggtc ctggatttgc aaggctgaat agaagagatg gagctggtgg 240
 ctgggtctcca cttgtgtcta acaaatacca gtggttgacg attgacctg gagagagaat 300
 ggaggtcacc gctgtggcca ctcaaggggg atatggtagc tccaactggg tgaccagcta 360
 cctcctgatg ttcagtata gtggctggaa ctggaaacaa tatcgccaag aggacagcat 420
 ctgggtatgt tctttaacaa aagacatagt ctctcgagga aaaagtataa tcagtactgc 480
 atcttgttta ocaatctctt aaattaagta gacatacaga atctgcagac ttacattgaa 540
 aacattttcc aagagaaaat atggtaaaata atcattttcc aatacatttt atggtaaaat 600
 tatgagaata taagggttaa atttatatta cagggttctc aaaaattgaa aaataaaccc 660
 tattagtcca ttaaatagtg tgggagtcta agaaataaat aagacttgta taaaaaaagt 720
 tttgttcaaa aacataatag tcttgcatg tcttttattt atttatttat ttattttatt 780
 atttatttat ttattttatt atttttgaaa cagagtctca ctctgtcacc cactgcactc 840
 cagcctggac aaggagtggtg actccgtctc aaaaaacaa aacaaaaaaa catcgactgc 900
 agcagtggtg gtggttttgg acccagtggt tcttcagaag caccaggggt atcattatag 960
 gctgccacta tttcctggta ccacaggata tttccatctc actaccatct gggtgacagg 1020
 gaataataaa atttagaaaac tgtaactggg ccggacagct attgacttgg tgagttgaaa 1080
 ctagaactat cttatgttca gtaaggccag tttaaagtgt tttggaagcc ttatataact 1140
 gagggcattg tacttcttgg tcactttaca aactaagttt ctttaatttt tactattccc 1200
 cacaattata ggacattggt ctgctcagaa acctttgtta tcaccacata acttgtattt 1260
 ttagtaaca gaacccccct ctttctgaat tcttcattga accttctga aagctgggtc 1320
 tgagtctcta ccaatgtata ttcatacatt gtgcatgtat tataaccatg tacaatggaa 1380
 gtgagcaatg tgtaaccata tgtctcagta tttgctagga tcatgatgct atgaagcaat 1440
 tgatagtcac ccttttcaact tattcccctt gctattccac atcactgott ttctctatcc 1500
 gtcgatgcca taaacagttt gtctgatggc tttctgattc atgaagatgg taaaagccaa 1560
 ggcctcaaaa cct 1573

<210> 5
 <211> 1312
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 ggcacgagct ctttctcccc ccatttctgc atacaagaaa ctgcatggac catcataoag 60
 cacaacggct ctgacttaac aagagtcaga aataactaat cagagaaccc atatgctggg 120
 ttttctgagt atgtggccag catggagcaa cttcaggcca ctattaaccg tgcagagcac 180
 tgtgaacagg agtttactta ttactgcaag aagtcacggc tggtaataaa goaagatgga 240
 acccctctga gttggtgggt aggaagaacc aatgaaacgc aaacctactg gggaggttct 300
 tcgctgatc ttcaaaaatg tacttgtgga tttagaggaa actgcattga ttctcagtat 360
 tactgcaatt gtgatgctga cgggaatgaa tggaccaatg aactggatt gcttgcctat 420
 aaagaacatc ttccagtaac taagatcgtg attacagaca caggccgact gcattcagaa 480
 gcagcttata aactggggcc tctgctctgc cggggagaca gatcattttg gaattcagct 540
 tccttttgata ccgaggcttc atatcttcat tttctacct tccacggaga acttagcgcg 600
 gatgtatctt tcttttttaa gacaacagct tcatctgggg tatttttaga gaacttgggg 660
 attgctgatt ttatacggat agagcttcgc tctccgacag tagtgacttt ttcatattgat 720
 gtggggaatg ggccttttga aatctcagtg cagtcacca cccacttcaa cgagctacct 780
 aagaacagct aaaagagcac accgctctat gtagcaaaat agtgggaaga ttatataggta 840
 gagggacaaa acctaccgag cctgggtgata gctggtgtgc caagatagaa tcttagttca 900
 acttttaatt tgeccacaga accctotaaa tccccttgta aatttaactg ttagtccaaa 960

gaggaacagc	tctttggaca	ctagggaaaa	accttgtaga	gagagtaaaa	aatttaacac	1020
ccatagtagg	cctaaaagca	gccaccaatt	aagaaagcgt	tcaagctcaa	caccactac	1080
ctaaaaaatc	ccaaacatat	aactgaactc	ctcacacca	attggaccaa	tctatcccc	1140
tatagaagaa	ctaattgttag	tataagtaac	atgaaaacat	tctcctccgc	ataagcctgc	1200
gtcagattaa	aacactgaac	tgacaattaa	cagcccaata	tctacaatca	accaacaagt	1260
cattattacc	ctcactgtca	acceaacaca	ggcattgtca	taaggaaagg	tt	1312

<210> 6
 <211> 1504
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6	
ggcagcaggt	60
cacttcaacg	120
cttcaagtgg	180
ttacagctca	240
ggctgcattc	300
gtgactccag	360
cgcaatggag	420
gcatacacag	480
gtgatataca	540
tcatttcagt	600
cgaacaccaa	660
attgccaaaa	720
gttgtaact	780
agagaagaag	840
tcacaggca	900
agtgatgtgg	960
gcagtgcagc	1020
cctgtcactg	1080
gccacatcaa	1140
gagccccctg	1200
gtgattttta	1260
ttatataaaa	1320
ttggtagctg	1380
ctgctagaga	1440
aatttcctga	1500
aaaa	1504

<210> 7
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7	
Met Gln Glu Phe Met Ala Leu Glu Leu Lys Asn Leu Pro Gly Glu Phe	
1 5 10 15	
Asn Ser Gly Asn Gln Pro Ser Asn Arg Glu Lys Asn Arg Tyr Arg Asp	
20 25 30	
Ile Leu Pro Phe Gln His His Gly Tyr Ser Gly Pro Asn Glu Arg Thr	
35 40 45	
Thr Phe Trp His Gly Ser Asn Glu Gly Ala Val Ser Leu Leu Leu Arg	

50 55 60
 Tyr Cys Ala
 65

 <210> 8
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 8
 Met Arg Ile Glu Val Tyr Gly Cys Ala Tyr Lys Ser Glu Val Val Tyr
 1 5 10 15

 Phe Asp Gly Gln Ser Ala Leu Leu Tyr Thr Leu Asp Lys Lys Pro Leu
 20 25 30

 Lys Pro Ile Arg Asp Val Ile Ser Leu Lys Phe Lys Ala Met Gln Ser
 35 40 45

 Asn Gly Ile Leu Leu His Arg Glu Gly Gln His Gly Asn His Ile Thr
 50 55 60

 Leu Glu Leu Ile Lys Gly Lys Leu Val Phe Phe Leu Asn Ser Gly Asn
 65 70 75 80

 Ala Lys Leu Pro Ser Thr Ile Ala Pro Val Thr Leu Thr Leu Gly Ser
 85 90 95

 Leu Leu Asp Asp Gln His Trp His Ser Val Leu Ile Glu Leu Leu His
 100 105 110

 Thr Gln Val Asn Phe Thr Val Asp Lys His Thr His His Phe Gln Ala
 115 120 125

 Lys Gly Asp Ser Ser Asn Leu Asp Leu Asn Phe Glu Ile Ser Phe Gly
 130 135 140

 Gly Ile Pro Thr Pro Gly Arg Ser Arg Ala Phe Thr Arg Lys Ser Phe
 145 150 155 160

 His Gly Cys Leu Glu Asn Leu Tyr Tyr Asn Gly Val Asp Val Thr Glu
 165 170 175

 Leu Ala Lys Lys His Lys Pro Gln Ile Leu Met Met Gly Asn Val Ser
 180 185 190

 Phe Ser Cys Pro Gln Pro Gln Thr Val Pro Val Thr Phe Leu Ser Ser
 195 200 205

 Arg Ser Tyr Leu Ala Leu Pro Gly Asn Ser Gly Glu Asp Lys Val Ser
 210 215 220

 Val Thr Phe Gln Phe
 225

<210> 9
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Met Gly Ser Val Thr Gly Ala Val Leu Lys Thr Leu Leu Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Thr Gln Asn Trp Asn Arg Val Glu Ala Gly Asn Ser Tyr Asp Cys Asp
 20 25 30
 Asp Pro Leu Val Ser Ala Leu Pro Gln Ala Ser Phe Ser Ser Ser Ser
 35 40 45
 Glu Leu Ser Ser Ser His Gly Pro Gly Phe Ala Arg Leu Asn Arg Arg
 50 55 60
 Asp Gly Ala Gly Gly Trp Ser Pro Leu Val Ser Asn Lys Tyr Gln Trp
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asp Leu Gly Glu Arg Met Glu Val Thr Ala Val Ala Thr
 85 90 95
 Gln Gly Gly Tyr Gly Ser Ser Asn Trp Val Thr Ser Tyr Leu Leu Met
 100 105 110
 Phe Ser Asp Ser Gly Trp Asn Trp Lys Gln Tyr Arg Gln Glu Asp Ser
 115 120 125
 Ile Trp Val Cys Ser Leu Thr Lys Asp Ile Val Ser Arg Gly Lys Ser
 130 135 140
 Ile Ile Ser Thr Ala Ser Cys Leu Pro Ile Ser
 145 150 155

<210> 10
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Met Glu Gln Leu Gln Ala Thr Ile Asn Arg Ala Glu His Cys Glu Gln
 1 5 10 15
 Glu Phe Thr Tyr Tyr Cys Lys Lys Ser Arg Leu Val Asn Lys Gln Asp
 20 25 30
 Gly Thr Pro Leu Ser Trp Trp Val Gly Arg Thr Asn Glu Thr Gln Thr
 35 40 45
 Tyr Trp Gly Gly Ser Ser Pro Asp Leu Gln Lys Cys Thr Cys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Gly Asn Cys Ile Asp Ser Gln Tyr Tyr Cys Asn Cys Asp Ala Asp
 65 70 75 80

```
<210> 11
<211> 410
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```

<400> 11
Met Lys Glu Ala Ser Leu Gln Val Asp Gln Leu Thr Pro Lys Thr Gln
  1             5             10             15

Pro Ala Pro Ala Asp Gly His Val Leu Leu Gln Leu Asn Ser Gln Leu
      20             25             30

Phe Val Gly Gly Thr Ala Thr Arg Gln Arg Gly Phe Leu Gly Cys Ile
      35             40             45

Arg Ser Leu Gln Leu Asn Gly Met Thr Leu Asp Leu Glu Glu Arg Ala
  50             55             60

Gln Val Thr Pro Glu Val Gln Pro Gly Cys Arg Gly His Cys Ser Ser
  65             70             75             80

Tyr Gly Lys Leu Cys Arg Asn Gly Gly Lys Cys Arg Glu Arg Pro Ile
      85             90             95

Gly Phe Phe Cys Asp Cys Thr Phe Ser Ala Tyr Thr Gly Pro Phe Cys
      100             105             110

Ser Asn Glu Ile Ser Ala Tyr Phe Gly Ser Gly Ser Ser Val Ile Tyr
  115             120             125

```

Asn Phe Gln Glu Asn Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Ser Ser Ser His Ala
 130 135 140
 Ala Ser Phe His Gly Asp Met Lys Leu Ser Arg Glu Met Ile Lys Phe
 145 150 155 160
 Ser Phe Arg Thr Thr Arg Thr Pro Ser Leu Leu Leu Phe Val Ser Ser
 165 170 175
 Phe Tyr Lys Glu Tyr Leu Ser Val Ile Ile Ala Lys Asn Gly Ser Leu
 180 185 190
 Gln Ile Arg Tyr Lys Leu Asn Lys Tyr Gln Glu Pro Asp Val Val Asn
 195 200 205
 Phe Asp Phe Lys Asn Met Ala Asp Gly Gln Leu His His Ile Met Ile
 210 215 220
 Asn Arg Glu Glu Gly Val Val Phe Ile Glu Ile Asp Asp Asn Arg Arg
 225 230 235 240
 Arg Gln Val His Leu Ser Ser Gly Thr Glu Phe Ser Ala Val Lys Ser
 245 250 255
 Leu Val Leu Gly Arg Ile Leu Glu His Ser Asp Val Asp Gln Asp Thr
 260 265 270
 Ala Leu Ala Gly Ala Gln Gly Phe Thr Gly Cys Leu Ser Ala Val Gln
 275 280 285
 Leu Ser His Val Ala Pro Leu Lys Ala Ala Leu His Pro Ser His Pro
 290 295 300
 Asp Pro Val Thr Val Thr Gly His Val Thr Glu Ser Ser Cys Met Ala
 305 310 315 320
 Gln Pro Gly Thr Asp Ala Thr Ser Arg Glu Arg Thr His Ser Phe Ala
 325 330 335
 Asp His Ser Gly Thr Ile Asp Asp Arg Glu Pro Leu Ala Asn Ala Ile
 340 345 350
 Lys Ser Asp Ser Ala Val Ile Gly Gly Leu Ile Ala Val Val Ile Phe
 355 360 365
 Ile Leu Leu Cys Ile Thr Ala Ile Ala Val Arg Ile Tyr Gln Gln Lys
 370 375 380
 Arg Leu Tyr Lys Arg Ser Glu Ala Lys Arg Cys Ser Cys Tyr Leu Val
 385 390 395 400
 Ala Val Leu Thr Ser Leu Val Ala Glu Leu
 405 410

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/05496

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12N 9/12, 1/20, 12/00; C07H 21/04; C07K 1/00 US CL : 435/104, 552.9, 520.1; 556/22.9; 550/350 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/104, 552.9, 520.1; 556/22.9; 550/350 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN files searched : Medline, Caplus, Biosis, Scisearch, Biotechids, uspatfull and embase. Search terms included : human ptyase, protein tyrosine phosphatase?, etc.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	NAGASE et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. DNA Res. December 2000, Vol. 7, No. 6, pages 347-355. Claimed SEQ ID NO : 3 (DNA) is 80.2% similar to Accession AB051501 in this reference.	1-12, 14-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" Earlier document published on or after the international filing date "C" Document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" Document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" Document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" Later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" Document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel, or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" Document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" Document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 11 JULY 2001		Date of mailing of the international search report 02 AUG 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3240		Authorized officer TERCHAND SAIDHA Telephone No. (703) 303-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Is International application No.
PCT/US01/05488

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra Sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos. Group I: 1-13 & 14-16, species SEQ ID NOS: 3 & 8

Remark on Protest

☐
☐

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

I local application No.
PCT/US01/05400

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

The following claims are generic :

Group I, claim(s) 1-12 & 14-16, drawn to nucleic acids (X) (X = SEQ ID NOS : 2-6) encoding polypeptides (Y) (Y = SEQ ID NOS : 7-11) and methods of making the polypeptides.

Group II, claim(s) 18, drawn to antibodies to polypeptides of SEQ ID NOS : 7-11.

Group III, claim(s) 17 & 22, drawn to methods of preventing, using polynucleotides of SEQ ID NOS 2-6.

Group IV, claim(s) 19-20, drawn to methods of diagnosis by determining absence of mutations in SEQ ID NOS : 2-6.

Group V, claim(s) 20-21, drawn to methods of identifying a binding partner to the polypeptides of SEQ ID NOS : 7-11.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack Unity of Invention because they are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for more than one species to be searched, the appropriate additional search fees must be paid. The species are as follows:

Each generic group listed above has 5 species corresponding to :

SEQ ID NOS : 2-6 (5 sequences), and/or

SEQ ID NOS : 7-11 (5 sequences).

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Group I has a special technical feature of the nucleotide sequences of SEQ ID NOS : 2-6 encoding polypeptides of SEQ ID NOS : 7-11, and methods of making the polypeptides of SEQ ID NOS : 7-11, which Groups II-V do not share; Group II has a special technical feature of an antibody, which Groups I & II-V do not share; Group III-V employ nucleic acid sequences of SEQ ID NOS : 2-6 or the encoding polypeptides of SEQ ID NOS : 7-11, however, in view of 37 CFR 1.475(b), when claims corresponding to different categories of invention are present then only (a) applies and additional methods of use are deemed to lack unity. Further, species of the sequences presented in Table 1 (SEQ ID NOS : 2-6 (DNA) or the encoding polypeptides of SEQ ID NOS : 7-11) are structurally diverse, derived from different clones having varied ORFs and diverse predicted epitopes. Thus the various groups and species discussed above show a lack of unity of invention.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ¹	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
A 6 1 P 5/00		A 6 1 P 9/10	4 C 0 8 4
9/00		17/02	4 C 0 8 6
9/10		25/00	4 H 0 4 5
17/02		25/28	
25/00		29/00	
25/28		31/00	
29/00		35/00	
31/00		37/00	
35/00		43/00	1 0 5
37/00		C 0 7 K 16/40	
43/00	1 0 5	C 1 2 N 1/15	
C 0 7 K 16/40		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		9/16	B
1/21		C 1 2 Q 1/42	
5/10		1/68	A
9/16		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/42		33/50	Z
1/68		33/53	D
G 0 1 N 33/15		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/50		5/00	A
33/53		A 6 1 K 37/54	

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, G M, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, B Z, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, J P, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 シ, ヤング

アメリカ合衆国 メリーランド 20878,
ゲイザースバーグ, ウェスト サイド
ドライブ 437, アpartment 102

(72)発明者 ルーベン, スティーブン エム.
アメリカ合衆国 メリーランド 20832,
オルネイ, ヘリテイジ ヒルズ ドラ
イブ 18528

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03

4B024 AA01 AA11 BA11 CA04 CA09
CA12 CA20 DA02 DA06 EA02
EA04 GA11 GA13 GA18 GA19
GA27 HA03 HA11 HA13 HA14
HA17

4B050 CC02 CC03 CC05 DD11 FF03E
FF11E FF20C LL01 LL03
LL05

4B063 QA01 QA05 QA13 QA17 QA19
QQ02 QQ21 QQ33 QQ41 QQ43
QQ53 QQ61 QQ89 QR08 QR13
QR32 QR35 QR40 QR56 QR62
QR77 QS16 QS25 QS34 QS36
QX01 QX02 QX10

4B065 AA26X AA58X AA72X AA90X
AA93Y AB01 AC14 BA02
BA05 BA25 BB01 BC01 BD14
CA31 CA44 CA46

4C084 AA01 AA06 AA07 AA13 BA01
BA08 BA22 CA18 DC22 NA14
ZA02 ZA33 ZA36 ZA59 ZA66
ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB05
ZB08 ZB09 ZB11 ZB15 ZB21
ZB26 ZB32 ZB33 ZB35 ZC02
ZC21

4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 MA04
NA14 ZA01 ZA33 ZA36 ZA59
ZA66 ZA81 ZA89 ZA96 ZB05
ZB08 ZB09 ZB11 ZB15 ZB21
ZB26 ZB32 ZB33 ZB35 ZC02
ZC21

4H045 AA11 CA40 DA75 EA20 EA50
FA71

THIS PAGE BLANK (USPTO).